

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва гранульованого препарату для захисту
рослин стрептофунгін. Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-62

Тарасюк Анастасія Дмитрівна _____

Керівник:

Зав. каф. Промислової біотехнології, д.т.н., доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. Біотехніки та біоінженерії, к.т.н.,

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Ст. викл. каф. екобіотехнології та біоенергетики

к.т.н.

Жукова Вероніка Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6217. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	92	
3	A1	ДП 6217. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6217. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6217. 03.000 ТК	Інокулятор	1	

				ДП 6217 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Тарасюк А.Д.				1	1
Керівн.	Тодосійчук Т.С.				КП ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консулт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Тарасюк Анастасії Дмитрівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва гранульованого препарату для захисту рослин стрептофунгін. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: продуцент *Streptomyces albus* UN44, призначення – препарат для захисту рослин від мікробних фітопатогенів, діюча речовина – комплекс антифунгальних антибіотиків, готова форма – гранульований препарат на цеоліті, по 3 кг п/е пакети, біореактор 3,2 м³.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва препарату стрептофунгін; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання

продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції інокулятора для ділянки підготовки посівного матеріалу, здійснити технологічний, конструктивний, тепловий та гідравлічний розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду інокулятора – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання 09.03.2020.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	09.03.20-26.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	27.03.20-15.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	16.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	30.04.20-15.05.20	
5.	Складання апаратурної схеми	15.04.20-30.05.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	15.05.20-30.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-10.06.20	

Студент

Анастасія ТАРАСЮК

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

**Пояснювальна записка
до дипломного проекту
на тему: «Технологія виробництва гранульованого
препарату для захисту рослин стрептофунгін.
Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить 92 сторінки, 14 рисунків, 3 таблиці, 3 кресленики, 71 літературне посилання, 1 додаток.

Метою проекту є розробка технології виробництва сухого гранульованого препарату для захисту рослин стрептофунгін від фітопатогенів. В якості продуцента препарату було обрано штам *Streptomyces albus* UN 44, отриманий в результаті індукованого мутагенезу з використанням нітрозогуанідину і ультрафіолетового випромінювання.

На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано інокулятор для вирощування посівного матеріалу, що забезпечує надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході культивування.

Для отримання готової форми на основі біомаси продуценту запропоновано грануляцію з використанням цеоліту для підвищення стабільності та ефективності готового продукту. Висушування продукту відбувається на розпилювальній сушарці, а готова форма отримується з використанням гранулятора.

СТРЕПТОФУНГІН, STREPTOMYCES ALBUS, ЗАХИСТ РОСЛИН, ФІТОПАТОГЕНИ, АНТИФУНГАЛЬНА ДІЯ, ЦЕОЛІТ, ГРАНУЛЯТ, ПОСІВНИЙ МАТЕРІАЛ, ІНОКУЛЯТОР.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Архів
Розробив	Тарасюк А.Д.					Д	5	92
Консульт.								
Керівник	Тодосіічук Т.С.					КПІ імені Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

ABSTRACT

The diploma project contains 92 pages, 14 figures, 3 tables, 3 drawings, 71 references, 1 appendix.

The aim of the project is to develop a technology for the production of dry granular preparation to protect plants streptofungin from phytopathogens. As a producer of the drug was selected a strain of *Streptomyces albus* UN 44, obtained by induced mutagenesis using nitrosoguanidine and ultraviolet radiation.

Based on the physiological and biochemical characteristics of the producer, an inoculator was selected for growing seed material, which provides oxygen to the culture and efficient mass transfer during cultivation.

To obtain a finished form based on the biomass of the producer, granulation using zeolite is proposed to increase the stability and efficiency of the finished product. The product is dried on a spray dryer, and the finished form is obtained using a granulator.

STREPTOFUNGIN, STREPTOMYCES ALBUS, PLANT PROTECTION, PHYTOPATHOGENS, ANTIFUNGAL ACTION, ZEOLITE, GRANULATE, SEED MATERIAL, SEED REACTOR.

					<i>ДП 6217. 00.000.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>	<i>Тарасюк А.Д.</i>				<i>ABSTRACT</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>6</i>
<i>Керівник</i>	<i>Тодосіччик Т.С.</i>					<i>Архів</i> <i>КПІ імені Ізгоря Сікорського</i> <i>Каф. ПБТ</i> <i>Гр. БТ-62</i>	
						<i>92</i>	

ЗМІСТ

ВСТУП	9
1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	11
1.1. Основні промислові продуценти	11
1.2. Систематичне положення	13
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	13
1.4. Культуральні ознаки	15
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки	16
1.6. Поширення в природі.....	18
2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	21
2.1 Характеристика кінцевого продукту	21
2.2. Схема хімічних перетворень	23
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	28
2.4. Методи очистки цільового продукту	29
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	30
3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	33
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту	33
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи	33
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	35
3.2. Загальні методи створення високоефективного продуценту.....	36
3.2.1. Використання індукованого мутагенезу	37
3.2.2. Використання генної інженерії	38
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	40
4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	41
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва	42
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	43

					<i>ДП 6217. 00.000.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробив</i>		<i>Тарасюк А.Д.</i>			<i>ЗМІСТ</i>		
<i>Консульт.</i>							
<i>Керівник</i>		<i>Тодасіччик Т.С.</i>					
					<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Архів</i>
					<i>Д</i>	<i>7</i>	<i>92</i>
					<i>КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62</i>		

4.3. Опис технологічного процесу	45
4.4. Матеріальний баланс.....	53
4.5. Контроль виробництва.....	55
5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	58
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату	58
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки	63
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	62
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища	78
ВИСНОВКИ.....	82
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	83
ДОДАТОК А	90

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	3 Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

ВСТУП

Оскільки пестициди хімічного походження, що використовуються для захисту рослин, мають значний негативний вплив на довкілля, виникає необхідність зменшення їхнього застосування. Вирішенням цієї проблеми може бути застосування в системі інтегрованого захисту рослин біотехнологічних препаратів на основі мікроорганізмів – антагоністів збудників хвороб рослин чи збудників хвороб шкідників рослин. Застосування біотехнологічних препаратів для захисту рослин ґрунтується на використанні природних закономірних взаємовідносин між патогенними організмами і сприйнятливими до них макроорганізмами, що забезпечує специфічну вибірковість методу. Біологічні агенти, що є основою таких препаратів, зменшують чисельність фітопатогенів до безпечного рівня і при цьому не завдають шкоди іншим видам тварин і рослин. Біопрепарати відносно безпечні для біосфери, оскільки не є чужорідними, а взяті з самої природи.

Продовольча і сільськогосподарська організація ООН з 2004 року рекомендує використання біотехнологічних сільськогосподарських культур і проголошує правомірність використання біотехнологічних методів для полегшення праці фермерів і покращення харчування населення країн, що розвиваються. Таким чином, біотехнологія знайшла своє застосування у галузі захисту рослин у вигляді препаратів біотехнологічного походження, що захищають рослини від хвороб та шкідників.

Актуальність теми полягає в тому, важко уявити сучасне сільське господарство без використання регуляторів росту, контролю чисельності шкідників, добрив, тощо. Цілком доцільно отримувати препарати цього напрямку біотехнологічним шляхом, зберігаючи ресурси сировини, енергоресурси, тощо. Оскільки біопрепарати, що описуються здатні до селективної дії на рослинні

ДП 6217. 00.000.00 ПЗ

ВСТУП

Стадія	Аркуш	Архів
Д	9	92
КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

фітопатогени, рослина не зазнає шкоди, а отже гинуть лише мікроорганізми-збудники.

Знизити активну роль фітопатогенів можна за допомогою інтродукції в агроєкосистему різноманітних мікроорганізмів, включаючи популяції антагоністів і мікробні препарати. Найбільш перспективні конкурентні форми мікробів-антагоністів ті, які характеризуються високою швидкістю росту і здатністю утворювати спори в великих кількостях, які виживають при дефіциті поживних речовин і в інших несприятливих умовах. Внаслідок широко поширеної серед міцеліальних прокаріотів здатності до синтезу антибіотиків і хітинази, актиноміцети можуть також виступати в якості природного захисту рослини від фітопатогенних грибів.

Стрептоміцети є типовими мешканцями різних ґрунтів, вони ідеально пристосовані до існування в гетерогенному ґрунтовому середовищі завдяки своїй міцеліальній організації.

Бактерії стрептоміцети з порядку актиноміцети є одною з найпоширеніших груп промислових продуцентів біологічно активних речовин, в тому числі фунгіцидних, що використовуються в сільському господарстві, ветеринарії, медицині. Більша частина нових препаратів мікробного походження для захисту рослин (фунгіцидів, інсектицидів, гербіцидів), що були досліджені останніми роками є метаболітами стрептоміцетів.

Метою дипломного проектування є розробка технології гранульованого препарату стрептофунгін для захисту рослин. Для досягнення мети були поставлені наступні задачі: підібрати і охарактеризувати продуцент препарату; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції інокулятора для ділянки підготовки посівного матеріалу, здійснити технологічний, конструктивний, тепловий та гідравлічний розрахунки.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

Важко уявити сучасне сільське господарство без використання регуляторів росту, контролю чисельності шкідників, добрив, тощо. Цілком доцільно отримувати препарати цього напрямку біотехнологічним шляхом, зберігаючи ресурси сировини, енергоресурси, тощо.

Речовини із антибіотичним впливом використовуються в рослинництві останні 25 років. Такі препарати можуть виступати у ролі фунгіцидів, гербіцидів, інсектицидів та стимуляторів росту рослини. Оскільки біопрепарати, що описуються здатні до селективної дії на рослинні фітопатогени, рослина не зазнає шкоди, а отже гинуть лише мікроорганізми-збудники.

У сільському господарстві наразі використовуються фунгіциди, що мають хімічне або біологічне походження. Останні також називають біофунгіцидами. Вони мають у своєму складі біомасу, що після потрапляння у ґрунт буде синтезувати біологічно активні речовини для рослини. Такі речовини є антибіотичними для грибів-збудників захворювань рослин.

Широко розповсюджені біофунгіцидні препарати, що складаються з культури *Bacillus subtilis* (препарат фітоспорин). Ці мікроорганізми виявляють антагоністичну дію проти фітопатогенів грибів завдяки продукуванню антибіотиків і ферментів. Окрім цього вони здатні стимулювати та активізувати розвиток рослин.

Є біофунгіциди, дія яких заснована на пригнічуванні розвитку фітопатогенів прямим паразитуванням та/або конкуренцією за субстрат. До них відносяться гриби роду *Trichoderma*(препарат триходермін).[1]

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Архів
Розробив	Тарасюк А.Д.					Д	11	92
Консульт.								
Керівник	Тодосіичик Т.С.					КПІ імені Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

Біофунгіциди на основі культури *Pseudomonas aureofaciens* (препарат псевдобактерин-2) можуть рятувати рослину від заморозків шляхом пригнічення росту льодоутворюючих бактерій *Pseudomonas syringae*. [2]

Такі препарати істотно знижують захворюваність рослин грибковими інфекціями, зокрема: фітофторозом, чорною ніжкою, фукаріозом, борошнистою росою; бактеріозами. Перевага над хімічними антибактеріальними і антифунгальними препаратами полягає в екологічності і відносній безпеці виробничого процесу.

Бактерії стрептоміцети з типу актиноміцети є одною з найпоширеніших груп промислових продуцентів біологічно активних речовин, в тому числі фунгіцидних, що використовуються в сільському господарстві, ветеринарії, медицині. Більша частина нових препаратів мікробного походження для захисту рослин (фунгіцидів, інсектицидів, гербіцидів), що були досліджені останніми роками є метаболітами стрептоміцетів. Варто зазначити, що більшість видів стрептоміцетів продукують антибіотичні речовини, що складають комплексні бактеріолізینی. Бактеріолізینی — речовини біологічного походження, що сприяють руйнуванню (бактеріолізу) бактеріальних клітин. [1,2]

Рослини здатні до асоціації з актиноміцетами, де останні стимулюють ріст рослин і захищають від комах завдяки продукуванню біологічно активних сполук, а також біостимуляції і біозахисту. Мінеральне постачання рослин може додатково забезпечуватися стрептоміцетами, оскільки вони здатні синтезувати сидерофори, а також системи їх постачання; стимуляція росту рослини у свою чергу забезпечується через синтез бактеріями біологічно активних речовин з фітогормональними властивостями. [3,4]

Отже, доцільно використовувати стрептоміцети для промислового отримання сполук із антифунгальною дією для подальшого використання у сільському господарстві для захисту рослин від фітопатогенів.

Обраний мікроорганізм-продуцент для цієї мети - *S. albus UN 44* (реідентифікований *Streptomyces recifensis var lyticus*) наразі описаний як

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

продуцент бактеріолітичних ферментів[5], рістстимулюючих речовин[1], сполук із антимікробною та антифунгіцидною активністю.[6] Остання властивість надала передумови для створення препарату стрептофунгін.[7] Новітній препарат стрептофунгін є комплексом антибіотиків антифунгальної дії. *S. albus* виявляє антагоністичні властивості щодо фітопатогенів родів: *Rizoctonia*, *Phytium*, *Bipolaris*, *Fusarium*. [8]

Таким чином мікроорганізм *S. albus* UN 44 був обраним для промислового культивування препарату для захисту рослин від фатогенів, зважаючи на властивість біомаси цього стрептоміцету продукувати комплекс антибіотичних речовин із фунгіостатичною активністю.

1.2. Систематичне положення

Мікроорганізм-продуцент комплексу антифунгальних антибіотиків для виготовлення препарату стрептофунгін належить до роду *Streptomyces*, сімейства *Streptomycetaceae*, порядку *Actinomycetales*, класу *Actinobacteria*, типу *Actinobacteria* та царства *Bacteria*. [9]

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

S. albus UN 44 так само, як і інші стрептоміцети росте і розвивається за складною програмою, що включає процеси міцеліального росту, скоординовану морфологічну і фізіологічну диференціацію мультигеномних гіф і міжклітинні комунікації. Багатоклітинність стрептоміцетів обумовлена насамперед морфологічною і фізіологічною диференційованістю формованих ними колоній, незворотність цієї диференціації, здійснення різних фізіологічних функцій окремими групами клітин («поділ праці») у складі колонії, наявність програмованої клітинної смерті як закономірною частини циклу нормального розвитку, «поведінку» колонії, цілісність її реакції у відповідь на виклики навколишнього середовища.

Давно було звернуто увагу на те, що формування такого складного утворення, як колонія стрептоміцетів починається з процесу проростання однієї

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

спори - одною чи кількома трубками проростання.[13] Зростання стрептоміцетів, як і зростання інших міцеліальних організмів - грибів, підпорядковується лінійній залежності. Гіфи стрептоміцетів збільшуються в довжину з постійною швидкістю, подовження відбувається в апікальній області [19]. Апікальний клітинний ріст (поляризований ріст, що відбувається за допомогою подовження клітини в одному напрямку) - специфічна і дуже важлива стратегія морфогенезу стрептоміцетів. Апікальне подовження гіф з їх подальшим розгалуженням в результаті появи нових точок зростання формує більш-менш розгалужену, більш-менш щільну мережу гіф – міцелій. [14]

Апікальний характер росту клітини полягає в тому, що вся «потужність» для синтезу речовин клітинної стінки і побудови самої клітинної стінки, зосереджена на одному полюсі клітини, що є точкою росту гіфи.

Вважається, що характер росту стрептоміцетів може бути одним з факторів, що роблять ці міцеліальні бактерії настільки екологічно успішними в освоєнні місць проживання та нових екологічних ніш. Подовження гіф верхівковою областю, супроводжуване їх розгалуженням, забезпечує стрептоміцетам можливість максимально захоплювати і освоювати життєвий простір за різними напрямками при пошуку ресурсів харчування. Це особливо ефективно, зокрема, в ґрунті з його, як правило, дискретно локалізованими ресурсами. Хрестоматійним також є твердження, що ріст організму у вигляді міцелію має певну екологічну перевагу перед ростом у вигляді поодиноких клітин в разі зустрічі з клітинами хижака. Показано, що при переході до росту у вигляді нитчастих форм виникає підвищена стійкість клітин до поглинання їх макрофагами в порівнянні з поодинокими клітинами, тобто перехід до міцеліальної форми - адаптивний відповідь, що приводить до збільшення виживання в умовах екзогенного стресу. [15]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

Ключовим моментом освоєння нових екологічних ніш стрептоміцетами є утворення репродуктивного повітряного міцелію. Ця подія описується як вирішальний етап морфогенезу, що має найважливіше екологічне значення. Гіфи повітряного міцелію, долаючи поверхневий натяг, залишають насичену вологою середу водне оточення, в якому живе субстратний міцелій, і ростуть вгору від поверхні колонії, в повітряне середовище [16]. Підкреслюється, що утворення повітряного міцелію відбувається як скоординована поведінка великого числа клітин на поверхні колонії.

При культивуванні штаму *S. albus UN44* колонія актиноміцетів утворює добре розвинений білий повітряний та безбарвний субстратний міцелій. Наявні органи спороношення – спороносці, що мають пряму чи трохи хвилясту форму, вони короткі та мало розгалуджені. Спори актиноміцету овальні і гладкі, утворюються вони шляхом фрагментації. Міцелій складається з клітин у вигляді гіфів з діаметром 0,7-0,9 мкм.[10]

1.4. Культуральні ознаки

Культура *S. albus UN44* добре росте на щільних поживних середовищах, утворює непрозору густу міцеліальну масу з легким запахом дусту. Колір колонії змінюється від білого або кремово-білого до жовтуватого-оливкового наприкінці вирощування. Форма колонії округла, поверхня шорсткувата, край рівний.[9,10]

Обидва повітряний і субстратний міцелії утворюються на різноманітних поживних середовищах при лабораторному вирощуванні: агарі Чапека, вівсяному агарі, мінеральному та органічному агарі Гаузе, глюкозо-аспарагіновому агарі та сусло-агарі. Субстратний міцелій завжди безбарвний. Колір повітряного міцелію змінюється залежно від середовища: блідо-білий на агарі Чапека, білий на вівсяному агарі та мінеральному агарі Гаузе, біло-кремовий на органічному агарі Гаузе, сіро-жовтуватий на глюкозо-аспарагіновому агарі та світло-кавовий на сусло-агарі. Жодного разу культура не утворювала меланоїдні пігменти при вирощуванні на середовищі з даними джерелами вуглецю.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

Вихідний (природний штам) *S. albus* 2435 також утворює субстратний і повітряний міцелій на всіх вищеописаних поживних середовищах. Субстратний міцелій завжди безбарвний. Колір повітряного міцелію змінюється залежно від середовища: безбарвний на агарі Чапека, білий на вівсяному агарі та мінеральному агарі Гаузе, біло-кремовий на органічному агарі Гаузе, сіро-жовтуватий на глюкозо-аспарагіновому агарі. Жодного разу культура не утворювала меланоїдні пігменти при вирощуванні на середовищі з даними джерелами вуглецю. [22]

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

Основними джерелами вуглецевого і азотного живлення при лабораторному вирощуванні на поживних середовищах є крохмаль і соєве борошно відповідно. Замість крохмалю можна використовувати редуковані цукри: глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, арабінозу, мальтозу маніт. Лактоза, дульцит, інозит, сахароза та рамноза слабо використовуються мікроорганізмами штаму. Даних щодо ауксотрофності *S. albus* UN 44 немає. Тип живлення – гетеротрофний, по відношенню до кисню – облігатний аероб.

Середовищ, що можуть використовуватися для забезпечення росту та збереження культури багато. Найкраще з досліджених культур *S. albus* UN44 росте на органічному агарі Гаузе та вівсяному агарі. Добрий ріст відмічається на сусло-агарі, мінеральному агарі Гаузе. На агарі Чапека та глюкозо-аспарагіновому агарі штам росте задовільно. В літературі найчастіше цю культуру актиноміцетів підтримували на органічному агарі Гауса, а вирощують посівний матеріал та проводять промисловий біосинтез на середовищі наступного складу: м'яса - 20г/л, соєве борошно дезодороване - 8г/л, NaCl - 14г/л, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 2 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,8 г/л, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 г/л, , пропінол Б-400 – 0,014 л (піногасник), вода водопровідна до 1 л. Оптимальне значення температури культивування – 28-30°C, а рН – 7,8-8,2[10]. Даних щодо граничних значень залежності росту від температури та рН для виду *S. albus* та зокрема штаму *S. albus* UN44 немає.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

Більшість представників роду Стрептоміцети ростуть при значеннях температури 25-30°C і рН 6,5-8,3, тому можна припустити, що ці дані є вірними і для штаму, який ми розглядаємо.

Тип енергетичного метаболізму цього мікроорганізму-продуценту – дихання.

Клітинна стінка, як і у інших бактерій складається з пептидоглікану(муреїну). Пептидоглікан клітинної стінки містить велику кількість L-діамінопімелевої кислоти (L-DAP). Вони містять велику кількість насичених і ненасичених жирних кислот, і мають складні полярні ліпідні структури, які зазвичай містять дифосфатидилгліцерол, фосфатидилетаноламін, фосфатиділінозитол і фосфатиділінозитол.[11,12]

У актиноміцетів роду стрептоміцети виявлена здатність до продукування великої кількості ферментів: протеази, амілази, кератинази, хітинази, активні окисно-відновлювальні ферменти групи поліфенолоксидаз, що забезпечують розщеплення стійких фенольних сполук, що входять до складу гумусу.

Серед стрептоміцетів досить багато продуцентів вітамінів групи В, зокрема вітаміну В12 та його аналогів. [13]

Стрептоміцет *S. albus* UN 44 здатний до синтезу ферментів протеази, глюкозамінідази, мурамідази, тощо. Ці ферменти обумовлюють властивість штаму(виду) виступати антагоністично до інших мікроорганізмів, тобто руйнувати їх клітинну стінку відповідним комплексом лізоензимних сполук. Такі бактеріолізینی здатні до руйнування клітин наступних видів: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium gravis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*. Більш стійкими, але такими, що все одно піддаються лізису при умові підвищеній концентрації лізоензимного комплексу речовин є такі мікроорганізми: *Streptococcus thermophilus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumonia* та ряд інших бактерій.[22]

Культура штаму *S. albus* UN44 на 4-5 день культивування продукувати комплекс антибіотичних сполук із антибактеріальною та антифунгальною активністю.[10]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Розмноження відбувається завдяки спорам, наявні органи спороутворення – спороносці. Стійкість до антибіотиків та актинофагів не вивчалася. *S. albus* UN44 є цілком безпечним та нешкідливим для теплокровних тварин і для людини зокрема.[10]

1.6. Поширення в природі

Бактерії роду Стрептоміцети широко поширені в ґрунті, включаючи компости.[12] Представники роду *Streptomyces* широко відомі як антагоністи збудників хвороб людини, тварин і рослин. З різних культур стрептоміцетів приблизно 60% виявляли антибактеріальну активність, наприклад, по відношенню до *Xanthomonas axonopodis*, збудника пустульного бактеріозу сої; до *Pseudomonas savastanoi*, збудника кутової плямистості сої. У дослідженнях антагонізму стрептоміцетів до фітопатогенних грибів 55% штамів стрептоміцетів проявили антифунгальну активність, наприклад, по відношенню до *Alternaria alternata*, збудника альтернаріозу томатів, *Fusarium oxysporum*, збудника фузаріозного в'янення томатів.

Відомо, що клітинні стінки грибів містять хітин, який багато в чому забезпечує їх резистентність до несприятливих факторів. Відомо, що хітинолітичні ферменти негативно впливають на ріст фітопатогенних грибів. Таким чином, властивість стрептоміцетів виявляти антифунгальну активність можна пояснити їх здатністю синтезувати хітинази. [17]

Знизити активну роль фітопатогенів можна за допомогою інтродукції в агроєкосистему різноманітних мікроорганізмів, включаючи популяції антагоністів і мікробні препарати. Найбільш перспективні конкурентні форми мікробів-антагоністів ті, які характеризуються високою швидкістю росту і здатністю утворювати спори в великих кількостях, які виживають при дефіциті поживних речовин і в інших несприятливих умовах. Внаслідок широко поширеної серед міцеліальних прокаріотів здатності до синтезу антибіотиків і хітинази актиноміцети можуть також виступати в якості природного захисту рослини від фітопатогенних грибів.[18]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

У ризосферних(ризосферавузька зона ґрунту, що безпосередньо оточує корінь) популяціях ячменю, конюшини лугової і озимого жита на дерново-підзолисті ґрунтах з високою частотою зустрічаються актиноміцети, які здатні синтезувати метаболіти, що суттєво обмежують або пригнічують ріст фітопатогенних грибів. У той же час в орному шарі типового чорнозему виявлені лише поодинокі актиноміцети-антагоністи з сильною антагоністичною активністю. [19]

Контакт з мікроорганізмами-антагоністами гальмує інтенсивність вегетативного росту фітопатогенного гриба: наростання довжини грибного міцелію як на коренях, так і в ризосферному ґрунті істотно поступається рослинам, що не мають стрептоміцетів у своїй ризосфері.

Інтенсивність інфекційного процесу, викликаного грибами-фітопатогенами, багато в чому визначається не стільки сумарною довжиною міцелію, скільки кількістю окремих міцеліальних фрагментів: чим більше їх кількість, тим інтенсивніше йде процес колонізації грибом простору і відповідно зараження рослин. Кількість міцеліальних фрагментів може коливатися в широких межах, але під впливом обробки насіння культурами антагоністів знижується особливо істотно на коренях, в меншій мірі - в ризосферному ґрунті. [18]

Гриби і актиноміцети є типовими мешканцями різних ґрунтів, вони ідеально пристосовані до існування в гетерогенному ґрунтовому середовищі завдяки своїй міцеліальній організації.

Ці перераховані ознаки часткового перекривання екологічних ніш грибів і актиноміцетів дозволяють вважати питання про значення міжпопуляційних взаємодій між ними одним з актуальних питань ґрунтової екології. Міжпопуляційні взаємодії актиноміцетів і грибів слід розглядати в якості одного з істотних механізмів регуляції формування і функціонування конкретного ґрунтового співтовариства. Поряд із зовнішніми факторами – абіотичними і антропогенного походження - міжпопуляційні взаємовідносини всередині мікробної екосистеми впливають на характер і швидкість розвитку біогеоценозу.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

Таким чином, показано, що актиноміцети, в основному представники роду стрептоміцети здатні виявляти потужний і одночасно різноманітний вплив на гриби ґрунту, який буде залежати і від особливостей гриба, і від біологічної активності актиноміцетів-продуцентів. [20]

При дії на гриб *Absidia cylindrospora* повідомляється лише про здатність пригнічувати їх ріст. По відношенню до гриба *Trichoderma citrinoviride* стрептоміцет-продуцент найчастіше впливає на спороутворення гриба. Целюлозолітичний мікроміцет *Sesquicillum candelabrum* порівняно стійкий до дії актиноміцетів: вони лише слабо пригнічують його ріст, але доволі сильно пригнічують синтез його характерних пігментів. До найбільш різноманітного впливу схильні види роду *Penicillum*, однак при цьому відносно небагато штамів роду стрептоміцети пригнічують ріст цих грибів, в основному відбувається пригнічення утворення спор.

Для ґрунтової біоти, що вивчається, великий інтерес можуть представляти випадки стимуляції актиноміцетами росту грибів роду *Penicillum* і целюлозолітика *S. Candelabrum*. Особливе значення може мати утворення темних за кольором сполук видами роду *Penicillum*. Цей факт цікавий тим, що такі сполуки звичайно асоціюються із речовинами гумінової природи, які відповідають за родючість ґрунту.

Можна вважати, що взаємодія між ґрунтовими актиноміцетами і грибами не є випадковою, хаотичною, а підпорядковуються певним закономірностям. [21]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Кінцевий продукт—препарат для захисту рослин стрептофунгін, що являє собою висушену і гранульовану біомасу живих клітин мікроорганізму *S. albus* UN44 і виявляє антифунгальну дію за рахунок синтезу комплексу антибіотичних сполук щодо грибних фітопатогенів рослин.

Комплекс антибіотичних речовин культури *S. albus* UN44 має провідну антифунгальну дію. Локалізація комплексу цих сполук може бути як ендогенною, так і екзогенною.

За допомогою хроматографічного аналізу (HPLC-аналіз і мас-детектор) встановлено дві основні антибіотичні речовини з комплексу сполук.

Перша речовина ідентифікована за біоінформаційними базами даних як біс(2-етилгексил)фталат ($C_{24}H_{38}O_4$). Молекулярна маса речовини становить 390,5, а її максимум поглинання при $\lambda=275$ нм. Молекулярна структура речовини зображена на рисунку 2.1.[22]

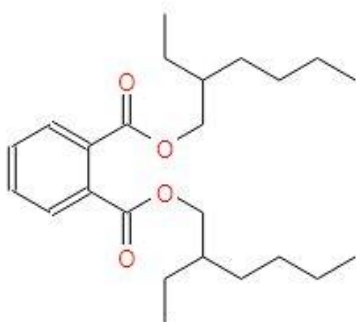


Рис. 2.1. Молекулярна структура антибіотичної речовини біс(2-етилгексил)фталату, що синтезується *S. albus* UN44.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Тарасюк А.Д.					
Консульт.							
Керівник		Тодосіючак Т.С.					
					РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА		
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	21	92
					КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

Біс (2-етилгексил) фталат - це ефір фталату, який є біс (2-етилгексил) ефіром бензол-1,2-дикарбонової кислоти. Це ефір фталату і діестер. Біс (2-етилгексил) фталат – масляниста рідина від безбарвного до блідо-жовтого. Майже без запаху. Температура кипіння -384 С , температура плавлення становить -55 С. Розчинність у воді – менше 0,01% при температурі 25 С. Густина при 25 С близько 981 кг/м³. [23]

Друга речовина ідентифікована за біоінформаційними базами даних як 3-о-метилциклополова кислота (C₁₂H₁₄O₆). Молекулярна маса речовини становить 254,2, а її максимум поглинання при λ=270 нм. Молекулярна структура речовини зображена на рисунку 2.2. [22]

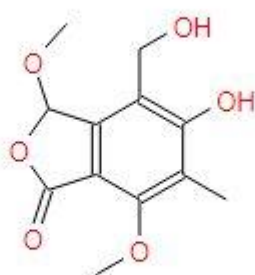


Рис 2.2. Молекулярна структура антибіотичної речовини 3-о-метилциклополової кислоти, , що синтезується *S. albus* UN44

Циклополова кислота є дигідропохідною сполукою від циклопальдової кислоти. Назва циклополової кислоти за IUPAC 3,5-дигідроксі-4-(гідроксиметил)-7-метоксі-6-метил-3H-2-бензофуран-1-1, вона була виділена із *Penicillium cyclopium* та *Aspergillus duricaulis*. В молекулярній структурі обох сполук наявна о-діальдегідна група, що відповідає за антифунгальні властивості речовини. [24-25]

2.2. Схема хімічних перетворень

Оскільки цільовим продуктом є препарат висушеної і гранульованої біомаси живих клітин, то надалі схема хімічних перетворень буде розглядатися на прикладі двох речовин із комплексу антифунгальних сполук, що продується клітинами *S. albus UN44*.

Біс(2-етилгексил)фталат є одним із найбільш розповсюджених фталатів, які виділяють з живих організмів у якості антибіотичної речовини. [29-31] Ефіри фталатної кислоти використовуються для виробництва хімічних продуктів, таких як пластмаса, текстиль, фарби, упаковка фармацевтичних продуктів, іграшки, косметика тощо. Ці сполуки зазвичай представляють собою жовтувату або білу маслянисту рідину з високою температурою кипіння і низькою летючістю.

Біс(2-етилгексил)фталат є складним етером о-фталатної кислоти і може утворюватися шляхом естерифікації останньої, як показано на рисунку 2.1.

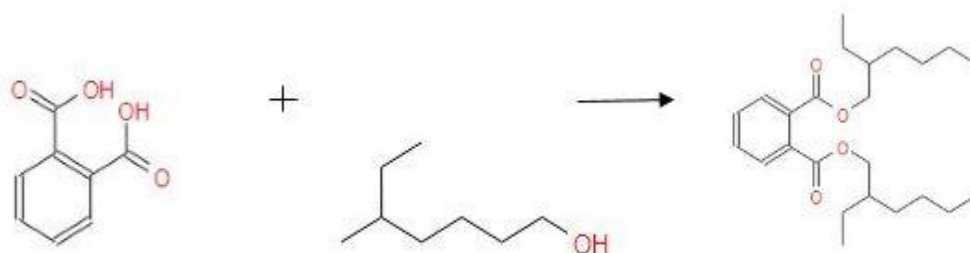


Рис. 2.1. Утворення біс(2-етилгексил)фталату

У літературі зазначають, що о-фталева кислота утворюється за невідомим механізмом з протокатехуанової кислоти, як показано на рисунку 2.2. [34]

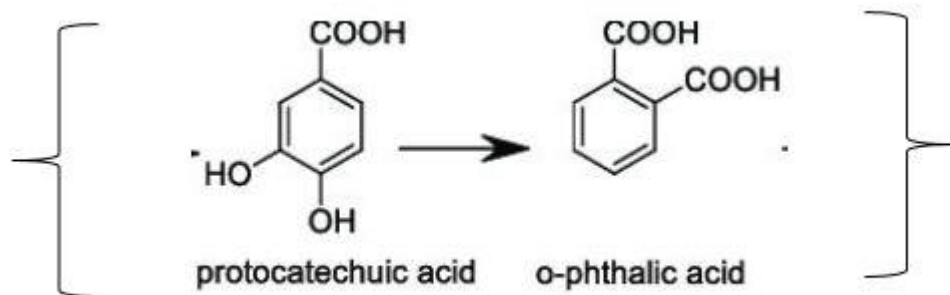


Рис 2.2. Утворення о-фталевої кислоти

Протокатехуанова кислота є вторинним метаболітом, що утворюється з хоризмової кислоти через 4-гідроксибензойну кислоту(4-ГБК). В реакції утворення прокатехуанової кислоти беруть участь два ферменти: НАДФ (1.14.13.33) та 4 ГБК-гідроксилаза (1.14.13.2). В реакції утворення 4-гідроксибензойної кислоти беруть участь хоризматна ліаза (4.1.3.40)

Хоризмова двохосновна кислота є проміжним ключовим метаболітом шикиматного шляху, що починається від глюкози. У випадку промислового культивування *S. albus* UN 44, середовищем цукрів для клітин мікроорганізму є м'яса. Шикиматний шлях — це метаболічний шлях, проміжним метаболітом якого є шикимова кислота. Він вважається спеціалізованим шляхом біосинтезу бензоїдних ароматичних сполук. У вузькому значенні шикиматний шлях є шляхом біосинтезу хоризмової кислоти, оскільки далі після її утворення він розгалуджується щонайменш на сім самостійних шляхів.[32]

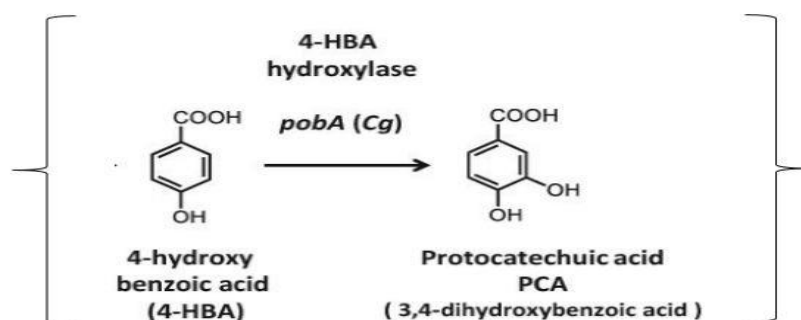


Рис. 2.3. Утворення прокатехуанової кислоти.(reaction R01298)[33,36]

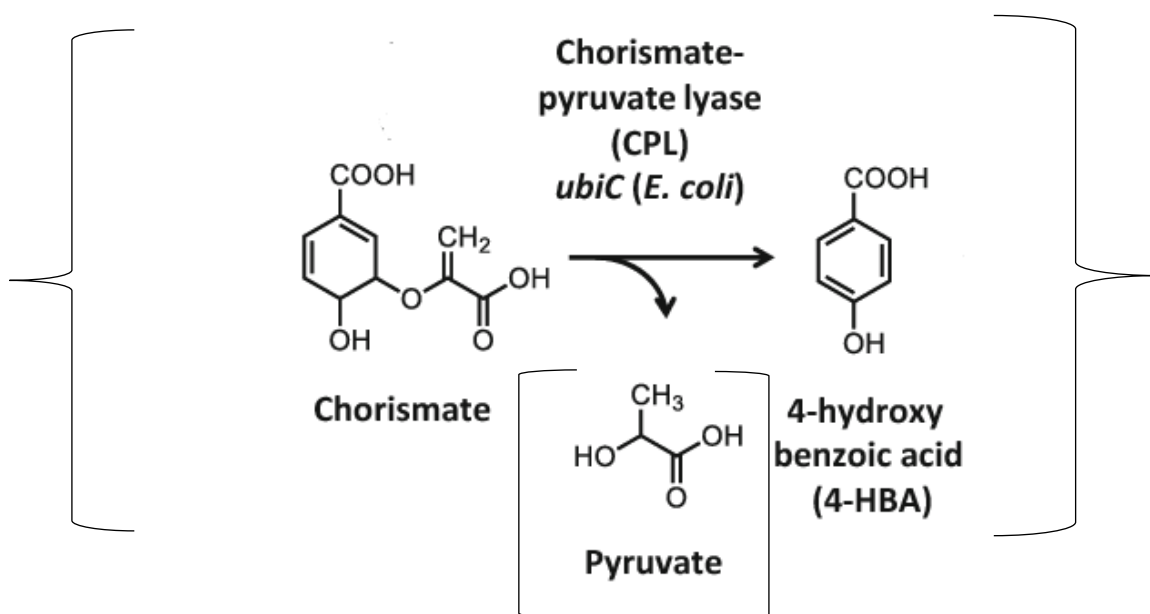


Рис. 2.4. Утворення 4-гідроксибензойної кислоти з хоризмової кислоти. (reaction R01302) [35,36]

Друга сполука, виділена з комплексу антифунгальних речовин, 3-о-метилциклополова кислота, є метиловим етером циклополевої кислоти і може утворюватися, як показано на рисунку 2.5.

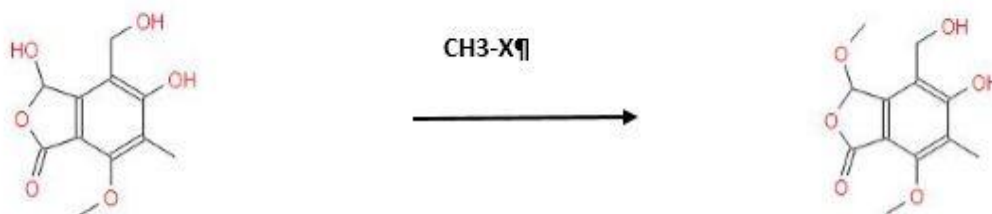


Рис. 2.5. Утворення 3-о-метилциклополової кислоти

Циклополова кислота, що за своєю природою є о-фталальдегідом може існувати у двох таутомерних формах, що здатні взаємно перетворюватись, як показано на рисунку 2.6.[27,28]

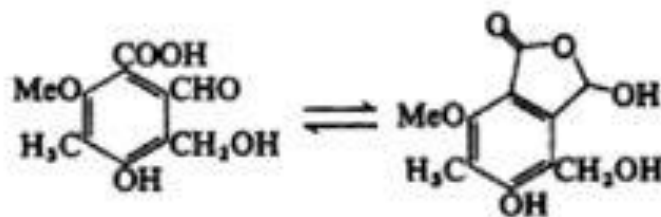


Рис. 2.6. Таутомерні форми циклополової кислоти

Вважається, що о-фталальдегіди слід розглядати як «третинні» метаболіти, можливо синтезовані індукованими ферментами, що утворюються у відповідь на накопичені всередині клітини вторинні метаболіти.

Циклополова кислота утворюється шляхом відновлювання циклопальдової кислоти, а точніше відновлюванням альдегідної групи у спиртову. Молекулярна структура циклопальдової кислоти зображена на рисунку 2.7.

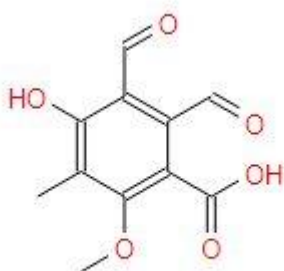


Рис. 2.7. Молекулярна структура циклопальдової кислоти

Точний механізм і метаболічний шлях утворення циклопальдової кислоти, на жаль, не встановлений достеменно. Відомо, що ця кислота утворюється з орсенілату, молекулярна структура якого зображена на рисунку 2.8

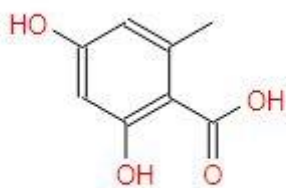


Рис. 2.8. Молекулярна структура орсенілату.

У свою чергу орсенілат утворюється невідомим шляхом з 6-метилсаліцилату, молекулярна структура якого зображення на рисунку 2.9.

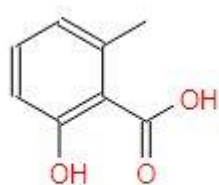


Рис. 2.9. Молекулярна структура 6-метилсаліцилату.

Приблизний молекулярний механізм реакцій утворення 6-метилсаліцилату і орсенілату з малонату та оцтової кислоти зображений на рисунку 2.10. [28]

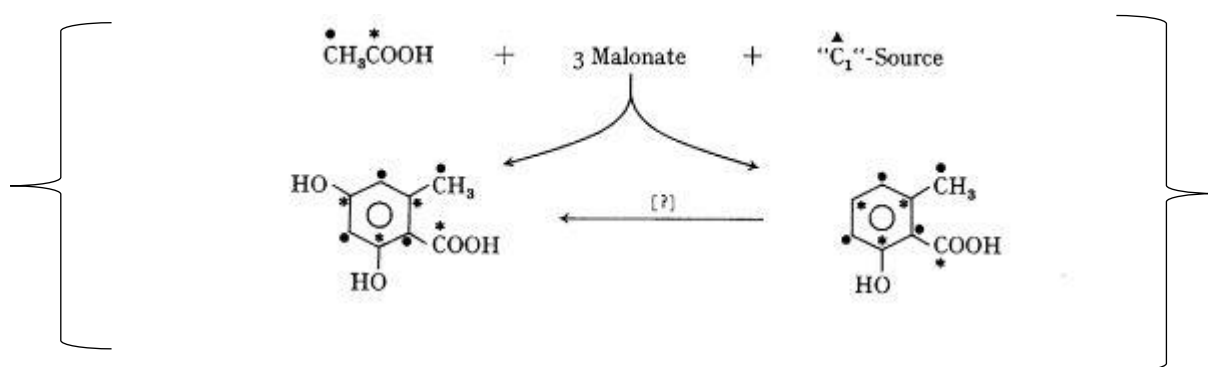


Рис. 2.10. Утворення орсенілату

Отже, меляса, як джерело цукрів для *S. albus UN 44* є необхідною для забезпечення шикиматного біологічного шляху, а також утворення органічних кислот, наприклад малонату та оцтової кислоти.

2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Основний компонентний склад готового цільового продукту стрептофунгін для рослинництва— це висушена біомаса продуценту *S. albus UN44*, діапазон вмісту якої складає 80-85% від маси усього препарату.

Культуральна рідина після виробничого біосинтезу містить комплекс антифунгальних речовин із фунгіостатичною активністю, що складається головним чином із двох сполук: 3-о-метилциклополової кислоти та біс(2-етилгексил)фталату. Частка комплексу цих сполук в препараті не перевищує 5%.

Допоміжним компонентом при виготовленні препарату для отримання його гранульованої форми є цеоліт, що застосовується для підвищення пористості, перешкоджає злипанню частинок. Цеоліт—природний мінерал, що складається з алюмосилікатів кальцію і натрію. Цей мінерал відомий завдяки його властивості поглинати і віддавати воду в залежності від температури і вологості, тобто своїми адсорбційними властивостями. Це стосується не тільки води, а й інших речовин, тобто окрім адсорбційних, цеоліт володіє ще іонобмінними властивостями: може вибірково поглинати і заново виділяти різні речовини, а також обмінювати катіони.

Цеоліт володіє властивостями, що дозволяють йому виступати стабілізатором по відношенню до середовища, у якому він знаходиться, наприклад, стабілізація рН. Також цеоліт може бути сорбентом для забруднень з ґрунту, наприклад, він зв'язує феноли і важкі метали. Вміст цеоліту у готовому препараті знаходиться в діапазоні 10-15%.

стрептофунгін є нестерильним препаратом для рослинництва, що містить висушену біомасу, а отже він не є біологічно чистим.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

Готовий препарат може містити домішки, пов'язані із тим, що штам *S. albus* UN44 є продуцентом багатьох речовин, окрім антибіотиків із фунгістатичною активністю. Це комплекс лізоензимних речовин та комплекс антисептиків із антибактеріальною активністю, що могли залишитись у препараті у залишкових кількостях після відділення біомаси. Дія на рослини цих біологічно активних речовин докладно описана у першому розділі дипломного проекту.

Окрім вищеперерахованих домішок, готовий препарат може містити домішки сухої речовини поживного середовища, що використовувалося для виробничого біосинтезу і не було цілком використано для анаболічного (синтетичного) метаболізму мікроорганізмами-продуцентами *S. albus* UN44.

Сумарна кількість домішок у препараті не перевищує 5%.

2.4. Методи виділення і очистки цільового продукту

Відомо, що антибіотичні сполуки штаму *S. albus* UN44 як секретуються у зовнішнє середовище, так і мають ендогенну локалізацію.

Отже, препарат захисту рослин від фітопатогенів може бути запропонований як на основі відділеної біомаси продуценту, так і на основі культуральної рідини. Готовою товарною формою препарату може бути стабілізована культуральна рідина, суспензія біомаси клітин або вигушена і гранульована біомаса. Останній варіант був обраний для розробки препарату стрептофунгін для рослинництва, зважаючи на високий рівень виживанності клітин при гранулюванні висушеної біомаси на цеоліті. Крім того, така товарна форма забезпечить значно довший термін зберігання.

Біомасу клітин-продуцентів для виробництва біопрепарату отримують з культуральної рідини центрифугуванням. Центробіжні сили у центрифuzі дозволяють відділити осад, що і буде біомасою від фугату. Фільтрування для отримання осаду біомаси не підходить через особливість мікроорганізму, а саме—великі гіфоподібні клітини стрептоміцету.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

Отриманий осад необхідно тільки достатньо висушити, оскільки товарною формою препарату є біомаса живих клітин продуценту. Концентрування суспензії біомаси відбувається завдяки випарюванню. Сушіння необхідно виконувати розпилювальним методом, оскільки за умов контактного сушіння життєздатної біомаси мікроорганізму залишиться дуже мало або не залишиться зовсім.

Отже, для виготовлення препарату висушеної і гранульованої на цеоліті біомаси живих клітин необхідно відділяти біомасу центрифугуванням, концентрувати у вакуум-випарному апараті та сушити вологу біомасу у розпилюючій сушарці.

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Цільовим продуктом є біомаса, що виявляє антифунгальною активність при її внесенні у ґрунт. Оскільки на сьогоднішній день досліджено і встановлено дві сполуки із цього комплексу (біс(2-етилгексил)фталат та 3-о-метилциклополова кислота), то механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси будуть описані на прикладі цих речовин.

3-о-метилциклополова кислота є о-фталальдегідом і наявністю саме цієї о-дифталальдегідної групи пояснюється її антибіотична активність. Відновлення або окислення цієї групи, внаслідок чого утворюється фталіловий спирт, формілбензойна кислота і диметилфталат, які вже не мають антибіотичної фунгістатичної дії.

До групи ароматичних антибіотиків, похідних фталевого альдегіду, окрім 3-о-метилциклополової кислоти відносяться також інші сполуки із антифунгальними властивостями: циклополова кислота, циклопальдова кислота, флавіпін, гладіолова і дигідрогладіолова кислоти. Всі вони утворюються завдяки одному і тому ж метаболічному біосинтетичному шляху і мають в своїй молекулярній структурі о-дифталальдегідну групу.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

Механізм дії однієї з таких сполук, антибіотику флавіпіну(що має антифунгальні властивості), докладно вивчений, тому можна припустити, що він досить схожий на механізм впливу 3-о-метилциклополової кислоти, завдяки спільній функціональній групі.

Флавіпін діє як мультисайтний інгібітор, що має плейотропну дію. Коли антибіотик впливає на клітинну мембрану, він змінює її селективну проникність і, головним чином, витік низькомолекулярних електролітів, таких як іони K^+ зсередини на зовнішню сторону клітини. Крім цього, ця сполука здатна пригнічувати дію мітохондрій, а отже всього клітинного дихання. Оскільки аеробні фітопатогенні організми отримують АТФ із дихального ланцюга, а отже після дії флавіпіну на клітину, рівень АТФ різко падає і клітина може користуватися лише на енергією, отриманою від процесів бродіння(гліколізу).

Є свідчення, що до переліку вищезгаданих механізмів можна додати вплив на білковий синтез, а саме порушення включення метіоніну в метаболізм клітин. Це може бути пов'язано з гальмуванням транспорту метіоніну в клітини або із гальмуванням синтезу білку.

Отже, антибіотики із о-дифтальальдегідною групою мають різні потенціальні мішені для виявлення інгібіторного впливу на клітинне дихання та білковий синтез.[38]

Біс(2-етилгексил)фталат є складним етером о-фталатної кислоти, тобто теж є ароматичною сполукою. Ця сполука здатна до індукції процесу програмованої клітинної загибелі та зупинки клітинного циклу у еукаріот; некрозу, при якому відбувається первинне пошкодження обміну речовин або мембранної цілісності клітини. [39]

Гинучи, клітини ще довго підтримують цілісність мембрани. З ними відбувається кілька морфологічних та біохімічних змін, включаючи конденсацію хроматину, ядерну сегментацію, внутрішньонуклеосомну фрагментацію ДНК, цитоплазматичну вакуолізацію

Зрештою, клітина розривається зсередини, що спричиняє виділення в середовище навколо неї апоптотичних тіл.[40,41] Центральний компонент цього механізму—сім'я аспартат-специфічних протеаз, що містять цистеїн. Ці протеази називаються каспазами. Каспазна діяльність, прямо чи опосередковано, відповідає за розщеплення декількох внутрішньоклітинних білків, які, як правило, протеолізуються. Рівень таких цих протеаз: каспази-8, каспази-9 та каспази-3, стрімко підвищувались після обробки клітини біс(2-етилгексил)фталатом. Також, окрім впливу на каспази, ця речовина здатна індукувати клітинний процес програмованої клітинної загибелі завдяки вивільненню цитохрому с з мітохондрій. [42]

Отже, антифунгальні речовини із комплексу антифунгальних сполук, що продукуються *S. albus* UN 44 швидше за всього виявляють свою антибіотичну дію щодо завдяки різним потенціальним мішеням для виявлення інгібіторного впливу на клітинне дихання та білковий синтез і індукції процесу програмованої клітинної загибелі у еукаріотичних клітин грибних фітопатогенів.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Рівень генетичної дослідженості мікроорганізму *S. albus* різниться в залежності від штаму: наприклад нуклеотидні послідовності штамів *S. albus* DSM 41398, *S. albus* ZD11, *S. albus* BK3-25, *S. albus* CAS922 секвеновані повністю. Що стосується штамів *S. albus* NRRL B-1811 та *S. albus* NRRL F-4971 *S. albus* NRRL B-16041, то їх геном секвенований лише на 25 %.[43] Генетичні карти мікроорганізму-продуценту наразі не зіставлені.

Дослідження філогенетичних зв'язків на базі аналізу даних сиквенсу гена 16S рРНК природного штаму мікроорганізму *Streptomyces* sp. 2435 показали досить високу (98%) близькість до 11 інших видів роду *Streptomyces*, що можна побачити на рисунку 3.1.[22]

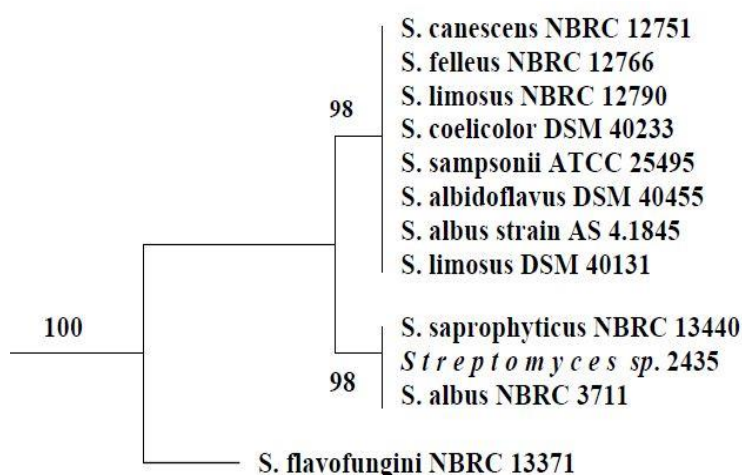


Рис. 3.1. Дендродрама філогенетичних зв'язків *Streptomyces* sp. 2435

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ			
					РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Архів
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		Д	33	92
Розробив		Тарасюк А.Д.						
Консульт.								
Керівник		Тодосіючик Т.С.				КПІ імені Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

Мікроорганізм *S. coelicolor*, який також можна знайти у наведеній дендрограмі є найбільш вивченим з генетичної точки зору і модельним організмом для багатьох аспектів генетики стрептоміцетів. Його геном на 98% співпадає із геномом *S. albus*. Генетична карта *S. coelicolor* знаходиться у додатку А.

Рестрикційні ферменти AseI, DraI і SspI розрізають хромосому *S. coelicolor* А3 на 17, 8 та 25 фрагментів, які можна розділити імпульсно-польовим гелевим електрофорезом. Суми їх довжини вказували, що хромосома складається з приблизно 8 Мб ДНК.

Хромосома *S. coelicolor* містить в собі 8 МБ інформації. Довжина відстаней між генами на генетичній карті була оцінена завдяки статистичному аналізу популяції гетероклонів. Колонії гетероклонов походять від частково або повністю диплоїдних клітин і містять спори різних гаплоїдних рекомбінантів, в тому числі і батьківських генотипів, що дає можливість безпосередньо визначати частоту генетичної рекомбінації між локусами. Якщо припустити, що цей неповний генний набір у кожному гетероклоні, розташований на суцільному сегменті хромосоми і що цей сегмент, у будь-якому конкретному гетероклоні, було отримано з повної хромосоми випадковим чином завдяки поломці, відносні довжини семи інтервалів між досліджуваними маркерами можна обчислити по патерну маркерів, які були гетерозиготними або гемізиготними в кожен гетероклоні у популяції.

Добре розвинені кон'югація, протопласт, злиття та клонування *in vitro* з бактеріофагами дозволили дослідити архітектуру декількох невеликих сегментів хромосоми, які несуть генні скупчення *S. coelicolor* А3, що відповідають за щонайменше п'ять вторинних метаболітів, чотири з яких антибіотики. генетичні Тому актуальність таких генетичних досліджень

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

пов'язана із аналізом генетичного контролю спороношення та його співвідношення з виробленням антибіотиків.[44,45]

3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Недостатня вивченість механізмів біосинтезу антибіотичних речовин із антифунгальними властивостями, що продукуються мікроорганізмом *S. albus* (наприклад, ферменти, що відповідають за утворення таких сполук — невідомі) не дозволяє провести аналіз літератури на базі генів, відповідальних за синтез цільового продукту, зважаючи на їхню невідомість.

У багатьох видах *Streptomyces* біосинтез антибіотиків контролюється регуляторними білками, особливо активаторами транскрипції. Надмірна експресія цих транскрипційних активаторів часто пов'язана із супутнім збільшенням титрів відповідних антибіотиків.

Отже, доречним буде розглянути механізми експресії генів, що відповідають за синтез інших антибіотиків із фунгістатичною активністю, що продукуються окремими представниками роду стрептоміцети.

Перший з таких антибіотиків—нікоміцин, продуцентом якого є *Streptomyces ansochromogenes*. Гени біосинтезу нікоміцину розташовані у трьох можливих блоках транскрипції, у яких *sanN*, *sanO* та *sanF* - відповідні перші гени. Специфічні регуляторні гени зазвичай згруповані з біосинтетичними генами антибіотику. Такий великий регуляторний ген, має назву *SanG* і знаходиться поруч з біосинтетичними генами нікоміцину. *SanG* здатний регулювати вироблення нікоміцину, контролюючи транскрипцію оперонів *sanO* та *sanN*.

Надмірна експресія цих транскрипційних активаторів часто пов'язана із супутнім збільшенням титрів відповідних антибіотиків. Коли в штам дикого

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

типу було введено рКСG (він містить *sanG* у мультикопії вектору рКС1139), виробництво ніккоміцину було збільшено, навіть незважаючи на те, що біомаса гібридів була подібною до штаму дикого типу. Отже, збільшення кількості копій *sanG* призводить до збільшення виробництва ніккоміцину. [46]

Полієновий макролідний антибіотик ністатин, що продукується бактерією *S. noursei*, є важливим протигрибковим засобом, який використовується в терапії для лікування певних типів мікозів людини. Безпосередньо беруть участь у регуляції біосинтезу чотири регуляторні гени, виявлені на кордоні кластеру генів ністатину. Для ефективного виробництва ністатину в *S. noursei* необхідні три можливих активатора транскрипції NysRI, II та III та гіпотетичний активатор транскрипції NysRIV з PAS-подібним доменом. Індивідуальна експресія регуляторних генів не призводить до різкого збільшення вироблення ністатину, що свідчить про необхідність узгодженої експресії.

Нові уявлення про ензимологію біосинтезу антибіотиків можна отримати при виділенні та характеристиці генів, відповідальних за його біосинтез. На прикладі ністатину, його хімічна структура виявляє особливості, характерні для макролідних антибіотиків, синтезованих полікетидними синтазами (PKS) типу I (модульні), які здійснюють конденсацію малих карбонових кислот у полікетидні ланцюги. Ферменти PKS I складаються з різних модулів, кожен з яких відповідає за один етап конденсації. Аналіз послідовності ДНК призвів до ідентифікації шести генів, що кодують модульну полікетид-синтазу, гени для тіоестерази, біосинтезу деоксисугару, модифікації, транспорту та регуляторних білків.

Гени для біосинтезу макролідних антибіотиків в *Streptomyces* організовані в кластери, що робить виділення повних наборів таких генів відносно простим. Успішне клонування кластеру генів ністатину передбачає

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

специфічну для PKS типу I, ампліфікований за допомогою ПЛР, з геному *S. noursei*.

Отже, механізми експресії антибіотиків у *Streptomyces* будуть залежати від того, як і у які кластери організовані домени генів, відповідальні за синтез, їх кількість та кількість їх копій, а також узгодженість експресії. [47,48]

3.2. Загальні методи створення високоефективного продуценту

3.2.1. Використання індукованого мутагенезу

Представники роду *Streptomyces* з їх без'ядерними гаплоїдними спорами, добре підходять для використання мутагенезу з метою отримання високопродуктивних продуцентів.

Окрім традиційного фізичного мутагену—ультрафіолетового випромінювання, використовують хімічні мутагени—N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідін (НТГ). Його дія пов'язана з тим, що в лужних розчинах він розкладається до нестабільної, мутагенної сполуки—діазометану, що є алкілюючим агентом. [51] Також для отримання мутантів використовується азотиста кислота HNO_2 , що характеризується яскраво вираженою мутагенною дією, оскільки є дезамінуючим агентом.

Продуктування антибіотичних речовин природним штамом *S. albus* 2435 недостатньо високе, тож для отримання штаму, що здатний до надсинтезу цільових сполук необхідно провести селекцію з використанням індукованого мутагенезу. Критерієм для відбору у цій процедурі виступала здатністю до надсинтезу антибіотичних сполук із антифунгальною активністю.

Багатоступінчаста селекційна робота починається із обробки 5-ти денної культури суспензії спор природного штаму мікроорганізмів *S. albus* 2435 N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном (30мг/мл) у фосфатному буфері 0,05 М (рН=6). Інкубація у такому розчині продовжується дві години,

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

після чого промивається двічі фосфатним буфером. Таким чином отримується штам *S. albus* 2435/M, який вже має підвищений на 150 % рівень синтезу лізоензимного комплексу.

Отриману культуру із концентрацією 10^8 кл/мл використовували для обробки ультрафіолетовим випромінюванням. 10 мл суспензії клітин у фізрозчині піддають УФ-опроміненню при постійному перемішуванні. Експозицію проводили за допомогою УФ-лампи з довжиною хвилі 254–255 нм в дозі 240 Дж / м². Всі маніпуляції необхідно проводити в темній кімнаті для уникнення фоторепарації. За описаною вище методикою був отриманий штам *S. albus* US101, рівень літичної активності якого вже на 190% вище за попередній.

В останню чергу отриману культуру штаму *S. albus* US101 оброблюють нітритною кислотою HNO₂. Для цього 0,2 мл суспензії спор із концентрацією 10^8 кл/мл необхідно змішувати з 5,6 мл 0,2 М оцтового буфера (pH 4,4–4,6) і 0,2 мл NaNO₂ у концентрації 0,5 М. Таку пробу потрібно інкубувати протягом 50 хв. Для припинення дії мутагену 0,5 мл переносять в пробірки з 4,5 мл 0,2 М стерильного фосфатного буфера (pH 7,0).

Це остання методика обробки мутагеном в багатоступінчастій селекції для отримання промислового продуцента *S. albus* UN 44. Рівень його продукування бактеріолізинів вище на 220% за попередній штам або на 3,5 рази вище за природній штам. Також отриманий штам мікроорганізму здатний продукувати стрептофунгін—комплекс антибіотичних речовин із антифунгальними властивостями, що активні щодо мікрококів та грибів роду *Candida*. [22, 10, 52]

3.2.2. Використання методів генної інженерії

Використання методів генної інженерії доцільно розглянути на прикладі штаму *S. albus* J1074, що широко застосовується для гетерологічних досліджень експресії завдяки мінімізованому геному (6,8 Мб), що дозволяє

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

швидко рости. Вони характеризуються десятками кластерів генів вторинних метаболітів та приділяють близько 10% своїх геномів відповідним біосинтетичним функціям. Штам можна використовувати для експресії різних генних кластерів і він є кращим господарем для експресії метагеномічних клонів ДНК, що кодують вторинні метаболіти. *S. albus* J1074 є ідеальним штамом для подальшої оптимізації його можливостей експресії генів за допомогою цілеспрямованої генетичної інженерії.

Біосинтез природних продуктів є високо регульованим, і генні кластери часто «мовчать», поки не будуть виконані необхідні їм умови. Експресія шляхів вторинних метаболітів знаходиться під контролем щільних і складних ієрархічних регуляторних мереж, які інтегрують безліч харчових сигналів, та сигналів з навколишнього середовища, сприйнятих плеiotропними та / або кластерно розташованими транскрипційними регуляторами. Підхід, який досить широко застосовується, полягає в тому, що плеiotропні регулятори, що впливають на більш ніж один біосинтетичний шлях, спрямовані на посилення своїх позитивних сигналів на користь вторинного метаболізму.

Делеція гену *rpfk* забезпечує підвищений рівень відновлення кофактора NADPH до біосинтетичних шляхів, що містять ферменти, що залежать від NADPH. Гетерологічна експресія актинорходіну сприяє цій генетичній модифікації. Надмірна експресія регулятора транскрипції CRP від *S. coelicolor* на фоні *S. albus* активує експресію пауломіцинів і функціонує синергетично з глобальними регуляторами, що контролюють інші способи регуляції вторинного метаболізму, як *rpfk*, для гетерологічної експресії актинорходіна. Видалення глобального антибіотичного регулятора WblA, викликало вироблення пауломіцинів у відповідь на продовження швидкого зростання та накопичення біомаси. Такі факти і дані свідчать про те, що раціональна, мультиплексна інженерія геномів—це ефективний спосіб розблокувати експресію нативних метаболітів та додатково посилити гетерологічні властивості експресії продуцентів. [49,50]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

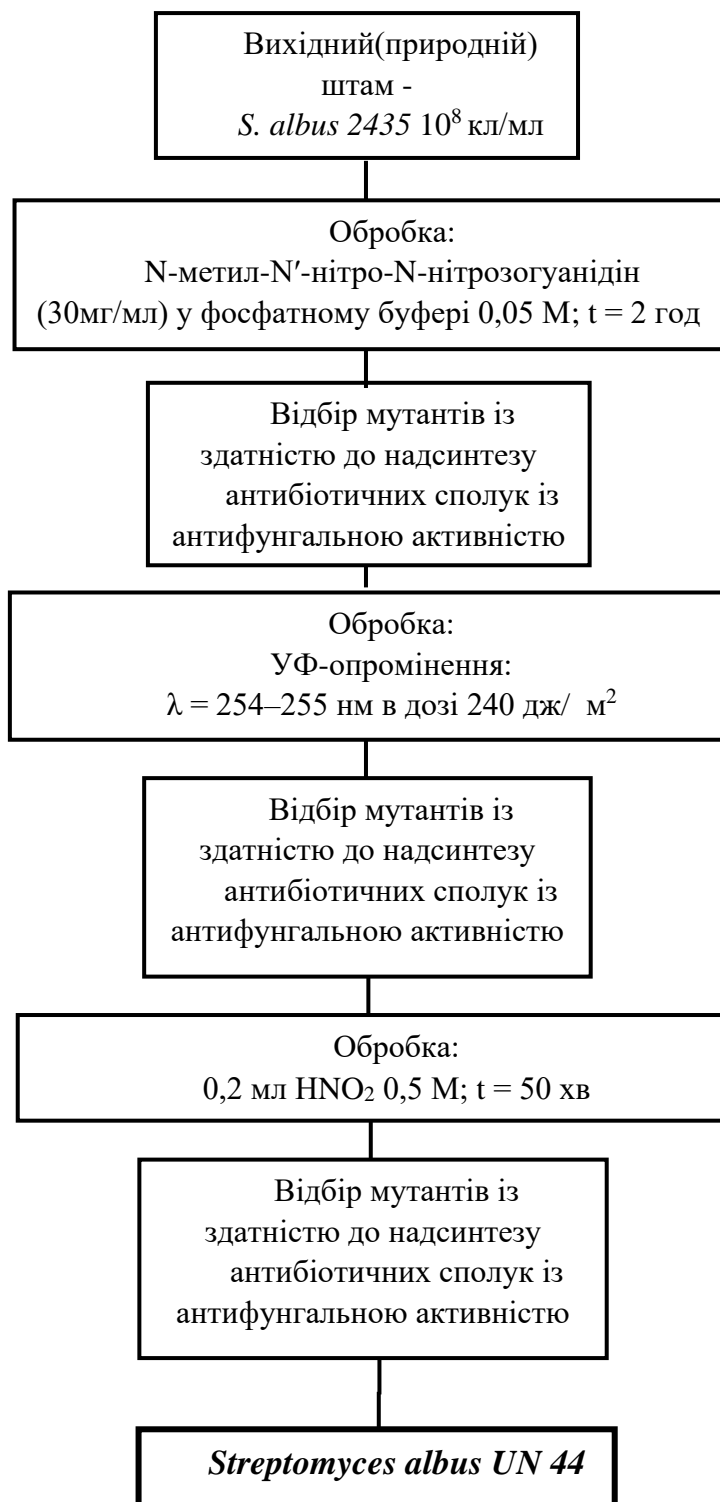


Рис 3.2. Схема отримання промислового продуцента *S. albus* UN 44.

4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Готовий товарний продукт має назву стрептофунгін, оскільки його цільові сполуки продукуються *стрептоміцетом* та мають провідну *фунгіостатичну* дію. Цей продукт представляє собою гранульовану на цеоліті біомасу живих клітин мікроорганізму *S. albus UN 44*.

Продукція, що виробляється призначена для її застосування у рослинництві. Препарат потрібно вносити у прикорневу зону ґрунту, для подальшого росту і розвитку міцеліальної культури стрептоміцету, в результаті якого він буде продукувати у ґрунт антибіотичні речовини із антифунгальною дією. Такі речовини здатні захистити рослину від впливу грибів-фітопатогенів, якими може бути з вирокою вірогідністю заражене насіння рослини(сама рослина, або її саджанець, тощо).

Готовий продукт представляє собою гранульований порошок із діаметром гранул 2-3 мм, вологістю 8%, сірого кольору.

Пакування відбувається у поліетиленові пакети по 3 кг біопрепарату кожний. Поліетиленові пакети мають відповідати вимогам ДСТУ 7275:2012.

Маркування наносять на одну із торцевих сторін тари за допомогою штампа, трафарету, етикетки або іншим способом, що забезпечує чіткість його читання, з зазначенням такої інформації:

- назви і адреси підприємства-виробника, його товарного знаку (за наявності) та місця виготовлення;
- назви препарату;
- номера партії виготовлення;
- кінцевого терміну реалізації або дати виготовлення та терміну придатності

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розробив		Тарасюк А.Д.					
Консульт.							
Керівник		Тодосіючик Т.С.					
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	41	92
					КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

- умов зберігання;
- маси нетто, брутто;
- позначення технічних умов щодо його виготовлення;

Транспортне маркування здійснюють згідно з ГОСТ 14192 з нанесенням маніпулятивного знаку «Оберігати від вологи» та зазначенням маси тари. Етикетку з позначеннями, наведеними вище вкладають в транспортну тару.

На кожній коробці або пакувальній одиниці фасованого стрептофунгіну повинні бути нанесені такі позначення:

- назви і адреси підприємства-виробника, його товарного знака (за наявності) та місця виготовлення;
- номери партії виготовлення;
- кінцевого терміну реалізації або дати виготовлення та терміну придатності;
- умов зберігання;
- маси нетто, брутто;
- штрих-коду EAN згідно з ДСТУ 3147
- позначення технічних умов щодо його виготовлення;

Препарат зберігають у сухому, захищеному від світла приміщенні, за температури повітря, яка не повинна перевищувати +20 С, відносної вологості – 85%. Термін придатності – 2 роки з дати виготовлення. Термін зберігання відповідає терміну придатності за умови належного зберігання і транспортування.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якого перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1.Основна сировина			
1.1. Меляса	ДСТУ 3696-98	Масова частка суми цукрів, що зброджуються, не менше 44 %	Для ПС (ДР 4.1)
1.2. Соєве борошно	ДСТУ 4543-2006	Масова частка сирого протеїну, не менше ніж 40 % на сухі речовини	Для ПС (ДР 4.1)
1.3. NaCl	ДСТУ 3583-2015	Порошок білого кольору, масова частка не менше 99,9%	Для ПС (ДР 4.1)
1.4. $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	ГОСТ 4198-75	Порошок білого кольору, масова частка не менше 99%	Для ПС (ДР 4.1)
1.5. $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	ДСТУ 2463-94	Порошок білого кольору, масова частка не менше 99%	Для ПС (ДР 4.1)

1.6. $MnCl_2 \times 4H_2O$	ГОСТ 612-75	Порошок рожевого кольору, масова частка не менше 98%	Для ПС (ДР 4.1)
1.7. Пропінол Б-400	ТУ 6-14-300-80	Згідно вимогам ТУ	Піногасник
1.8. Цеоліт	ТУ У 15,7-31251965- 00:2009	Згідно вимогам ТУ	Для гранулювання (ТП 10)
2. Допоміжна сировина			
2.1. Синтетичний миючий засіб	ДСТУ 2665-94	Вміст активного хлору 4,86%	Для очистки (ДР 1.2, ДР 1.3, ДР 2)
2.2. Дезинфікуючий засіб	ГОСТ 177-88	Масова частка перекису 30%- 40%	Для очистки (ДР 1.2, ДР 1.3, ДР 2)
2.2 Вода питна	ДСТУ 7525-2014	рН 6,0-8,0; хлориди - не більше 350 мг/дм ³ ; жорсткість загальна - не більше 7 моль/дм ³	
2.3. Вода технічна	ГОСТ 17.1.1.04-80:	Згідно вимогам ГОСТу	Для теплообміну
3. Матеріали			
3.1 Фільтр тонкої очистки ФТО-60	ТУ У 29.2-04624312- 028-2002	Згідно вимогам ТУ	Для підготовки повітря (ДР 3.6.)
3.2. Поліетиленові пакети	ГОСТ 12302-2013	Маркування, цілісність	Для пакування
3.3. Коробки	ГОСТ 26663	Маркування, цілісність	Для готової продукції
4. Напівпродукти			

4.1. Посівний матеріал	Регламент	Концентрація біомаси не менше, ніж 20 г/л	На ТП 6
4.2. Культуральна рідина	Регламент	Концентрація біомаси не менше, ніж 35 г/л	На ТП 7

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва.. Підготовка персоналу (**ДР 1.1.**) включає санітарно-медичне обстеження (**ДР 1.1.1.**), навчання персоналу (**ДР 1.1.2.**), підготовка працівників до роботи в різних типах приміщень і лабораторіях, цехах (приміщеннях різних класів чистоти), знання вимог охорони праці (**ДР 1.1.3.**).

Перед початком роботи на виробництві працівник зобов'язаний прочитати, вивчити та здати атестацію з інструкцій, документів по роботі, яку цей працівник безпосередньо буде виконувати, правил роботи та поведінки у виробничих приміщеннях, лабораторіях, вимог охорони праці.

Приготування миючих дезінфікуючих розчинів (**ДР 1.2.**), які призначені для обробки обладнання і комунікацій, здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Для обробки виробничих приміщень, обладнання та комунікацій готують розчин перекису водню (дезінфікуючий засіб) та розчин синтетичного порошкоподібного миючого засобу.

Обробка приміщень (**ДР 1.3.**), зовнішніх поверхонь апаратів та комунікацій проводиться розчинами миючого засобу із подальшою обробкою дезінфікуючими розчинами і чистою водою. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів. Таким чином

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

оброблюються виробничі приміщення (ДР 1.3.1.), лабораторні (ДР 1.3.2.) та допоміжні (ДР 1.3.3.). На даному етапі контролюється запиленість приміщення і концентрація мікроорганізмів у повітрі виробничих приміщень.

Обладнання миють (ДР 2.1.) теплим розчином синтетичного миючого засобу при його температурі у 40 С. Знімальні частини (вузли) обладнання, які безпосередньо торкаються з сировиною або її проміжними продуктами, знімають, розбирають і миють розчинами миючих засобів та водою питною за тієї ж температури. Ополіскування обладнання проводиться водою. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів.

Для дезинфекції обладнання (ДР 2.2.), його повністю заповнюють розчином антисептика і витримують протягом 1,5 години при температурі 55 С. Після обробки антисептиками, обладнання та комунікації промивають декілька раз питною водою. Відпрацьовані розчини та промивні води надходять до стадії знешкодження відходів.

Стерилізація обладнання (ДР 2.3.) необхідна для стерилізації і знешкодження всіх мікроорганізмів, спор. Стерилізація є важливим процесом перед початком використання обладнання та повинна чітко контролюватися для досягнення стерильності апарату. Стерилізація обладнання відбувається подачею перегрітої насиченої водяної пари (гострої пари) всередину герметично закритого апарату. Температурний режим: температура 125-130°С, тиск 0,2 МПа, час 1 год.

Культивування мікроорганізму - продуценту біологічно активних речовин в глибинних умовах крім власне біосинтезу включає ряд допоміжних технологічних операцій. Перш за все це отримання стисненого стерильного повітря, що подається на аерацію, приготування і стерилізація живильного середовища, підготовка посівного матеріалу. Ці операції багато в чому визначають якісні та кількісні показники процесу біосинтезу, тому до їх апаратурним оформлення та режиму роботи пред'являють підвищені вимоги.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

При вирощуванні мікроорганізмів в глибинних умовах потрібна безперервна подача стерильного повітря в ферментатори, на аерацію культуральної рідини. Повітря, що подається в ферментатор, не тільки постачає культуру, що росте киснем, а й відводить газоподібні продукти обміну і фізіологічне тепло, що виділяється мікроорганізмами в процесі розвитку, дозволяє досягати однорідності мікробної суспензії, збільшує швидкість масопередачі і перемішування рідкого живильного середовища.

ДР 3. Підготовка стерильного повітря. Забір повітря відбувається через повітрязабірник (ДР 3.1.). Далі відбувається попередня очистка від механічних домішок.(ДР 3.2.) Фільтри такого типу встановлюють на всмоктуючої лінії перед компресором. Шляхом інерційного осадження очищають повітря від великих часток розміром більше 5 мкм. У фільтруючих матеріалах передбачаються великі проміжки між елементами, що уловлюються, для максимального зниження опору потоку при високій швидкості фільтрації повітря - 1,5-3,0 м / с. Щоб сухі частинки після осадження при такій швидкості потоку не виносилися з фільтра, шари його промаслюється. Тому фільтри такого класу називають масляними. З касетні регенеровані масляних фільтрів найбільшого поширення набули сіткові фільтри типу ФЯР. Такі фільтри прості, надійні в експлуатації, вловлюють мікроорганізми і частинки пилу розміром більше 5 мкм. Такий фільтр затримує на поверхні насадки 92-99% повітряної пилу.

Далі цього необхідно попередньо стиснене повітря в компресорі охолодити для конденсації парів вологи. Стиснення повітря до 350-500 кПа здійснюється в компресорі (ДР 3.3.), охолодження до температури 30-40 ° С в теплообміннику-рекуператорі з подальшим відділенням конденсату у вологовідділювачем. На вході і виході з холодильника температура та повітря контролюється приладами.

Стерильність повітря для аерації під час виробничого біосинтезу забезпечують головні(грубої очистки) та індивідуальні(тонкої очистки) фільтри. Головні фільтри (ДР 3.4.) призначені для уловлювання основної маси

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

забруднень, що потрапили в систему після проходження фільтрів попереднього очищення і компресора, а також для подовження терміну служби фільтрів тонкого очищення, що виконують основний процес стерилізації на стадії фільтрації. Головний фільтр зазвичай є вертикальною посудиною з ґратами у днища. В якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно. Головні фільтри стерилізують гострою парою протягом 4 год при тиску 0,12-0,15 кПа, а потім просушують сухим повітрям. Фільтри тонкого очищення (ФТО-60) і стерилізації (**ДР 3.5.**) необхідні для уловлювання забруднень, пропущених іншими фільтрами, а також всіх можливих забруднень, які потрапили в систему з випадкових причин. Робота цих фільтрів повинна бути особливо надійною, оскільки це останній ступінь очищення і стерилізації повітря на шляху до ферментаторі. Для стерилізації фільтру гостру пару подають в повітряний трубопровід. Пара повинна надходити чистою і сухою з температурою 120 ° С при стабілізованому тиску. Тривалість стерилізації коливається від 30 до 60 хв залежно від виду фільтруючого матеріалу. За використання комбінації таких фільтрів можна отримати майже 100% чисте стерильне повітря (< 1 КУО м³).

ДР 4 .Приготування поживного середовища. Змішування компонентів поживного середовища (**ДР 4.1.**) відбувається у окремому реакторі, звідки потім вже стерилізоване, по трубопроводам поступає в інокулятор та ферментер для вирощування (посівної) культури. Стерилізація гарячою водяною парою відбувається при 125°С протягом 15 хв та надлишкового тиску 0,05 Мпа. Після цього отримане стерильне середовище необхідно охолодити у теплообміннику до температури культивування—27-29°С. (**ДР 4.2.**)

Необхідна умова успішної стерилізації живильного середовища - ретельна гомогенізація її твердих компонентів. Швидкість розчинення речовини в рідині пропорційна потужності мішалки, що припадає на одиницю об'єму рідини. У зв'язку з цим реактори для приготування живильного середовища повинні бути забезпечені досить потужними мішалками,

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

а також перегородками-відбивачами, що не допускають завихрення і обертання рідини в апаратах.

Склад поживного середовища для промислового культивування *S. albus* UN 44: соєве борошно дезодороване - 8г/л, меляса 20 г/л, NaCl - 14г/л, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 2 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,8 г/л, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,04 г/л, пропінол Б-400 – 0,014 г/л (піногасник). рН готового поживного середовища має бути в діапазоні 7,8-8,2.

ДР 5. Підготовка посівного матеріалу. Для отримання посівного матеріалу використовують вихідну музейну культуру продуцента. Як правило, посівний матеріал, що містить молоді, що ростуть клітини мікроорганізмів з початкової стадії спороутворення (спори, конідії), надходить в пробірках на скошених щільних середовищах, у вигляді чистих культур в ампулах. Вихідну культуру при оптимальних температурах пересаджують і вирощують в пробірках на скошеному агаризованому живильному середовищі. (ДР 5.1.) Для мікроскопічних грибів, актиноміцетів вирощування триває до настання рясного спороутворення.

Велике значення має якість посівного матеріалу. Перенесення мікробних клітин з однієї стадії вирощування в іншу бажано здійснювати тоді, коли зростання популяції відбувається з максимальною швидкістю, тобто в фазі так званого логарифмічного зростання.

Для підвищення титру клітин в інокуляті і збільшення кількості посівного матеріалу культуру вирощують в кілька стадій.

Вирощену культуру (1-5% до обсягу) з поверхні скошеної агаризованого середовища стерильно змивають водою і переносять в колби Ерленмейера на 750 мл, що містять 100 мл рідкого живильного середовища. (ДР 5.2.) Засіяні колби вирощують на гойдалці (220-240 об / хв) при температурі 28-30° С протягом 18-36 год. Вирощування на гойдалці при перемішуванні (струшуванні) збільшує швидкість росту культури, що пов'язано з

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		49

інтенсифікацією масообміну. Цю стадію вирощування контролюють за морфологічними показниками мікроорганізму. Найкращі результати дає культура, яка знаходиться в стадії фізіологічної зрілості в кінці логарифмічної фази зростання.

Готову культуру стерильно переносять в посівний апарат (інокулятор) (**ДР 5.3.**) з попередньо простерилизованим живильним середовищем. Концентрація посівної культури має складати 5% від об'єму поживного середовища. Посівний апарат має бути оснащений мішалкою, аеруючим пристроєм, а також контрольно-вимірювальною апаратурою для регулювання температури, рН середовища. Вирощування посівної культури в інокуляторі триває 48 год, при температурі 27-29 С. Аерація має складати 0,4V повітря/1V на хвилину, перемішування—300 обертів на хвилину.

ТП 6. Виробничий біосинтез. Процес виробничого біосинтезу відбувається у ферментері впродовж 96-120 годин, при температурі 27-29 С, рН=7,8-8,2. Тиск у ферментері необхідно підтримувати на рівні 0,05 МПа. Аерація має складати 0,4V повітря/1V на хвилину, перемішування—300 обертів на хвилину.

Після процесу культивування необхідно подати у рубашку ферментера холодну воду із температурою 7-10°С для охолодження культуральної рідини.

ТП 7. Відділення біомаси центрифугуванням. Охолоджену культуральну рідину надалі потрібно направити на центрифугування, тобто відділення біомаси при 3 000 обертів на хвилину. Фугат направляють на знешкодження, а біомасу у вакуум-випарний апарат.

ТП 8. Концентрування суспензії вакуум-випаровуванням. Подальше концентрування відділеної суспензії біомаси відбувається у вакуум-випарному апараті. При зниженому (0,03 МПа) тиску надмірна волога у суспензії біомаси випаровується при досить низькій температурі—40°С.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

ТП 9. Висушування препарату. Таку вже концентровану, але все ще вологу суспензію направляють на сушку в розпорошувальній сушарці. У повітрі завжди знаходяться механічні частки, від яких потрібно вивільнити повітря.

Для запобігання абразивного зношення компресійного обладнання необхідне видалення механічних частинок з повітря, що поступає у вентилятор. Частки, у яких діаметр більший за 5 мкм, залишаються на фільтрі. Нагрівання повітря здійснюється у калорифері. Тепловим агентом є насичена пара $P=0,3$ МПа. Повітря нагрівається до температури 200 С, контролюється його температура за допомогою мідного термоперетворювача опору. Температура вхідного повітря у сушарку повинна бути нагріта теплоагентом до 200°C, а вихідного—70°C. За такою методикою можна отримати порошок із вологістю 5%. Сушіння концентрату відбувається у дисковій розпилювальній сушарці з нижньою подачею теплоагенту. Волога випарюється, а висушені часточки порошку осаджуються в конусному днищі.

Напівпродукт через шлюзовий затвор за допомогою системи пневмотранспорту надходить в розвантажувальний циклон. Повітря для забезпечення пневмотранспорту забирається за допомогою повітрязабірника. Транспортне повітря очищується на фільтрі від механічних часток, діаметр яких більше 5 мкм. Через повітропровід відпрацьоване повітря разом з дрібними часточками продукту потрапляє в систему очищувальних циклонів. Повітря тут віддаляється за допомогою вентилятора, а продукт падає вниз, та за допомогою системи пневмотранспорту надходить в розвантажувальний циклон.

ТП 10. Гранулювання препарату. Наступний апарат—гранулятор, необхідний для надання вже висушеній біомасі товарної форми гранул на цеоліті. Для цього у змішувачі гранулятора відбувається кондиціонування препарату, тобто доведення вологості і температури(80°C) до рівня, необхідного для процесу гранулювання. Із змішувача зволожений препарат

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

виводиться в прес - гранулятор. Гранули, що виходять із преса, мають високу температуру і неміцні, тому вони транспортуються в охолоджувальну колонку. Тут через шар гранул вентилятором циклону всмоктується повітря, яке охолоджує гранули і одночасно відсмоктує частину препарату, що не перетворився у гранули в циклоні. У процесі охолодження вологість гранул зменшується за рахунок випаровування вологи, і в гранулах відбуваються фізико-хімічні зміни.

ТП 11. Фасування препарату. Останній етап виробництва полягає в фасуванні отриманого охолодженого грануляту висушеної біомаси апаратом для пакування продукції на автоматичній лінії у поліетиленові пакети по 3 кг препарату біомаси.

ЗВ 12. Знешкодження відходів та викидів. Відпрацьовані розчини від ДР 1.2, ДР 2, ТП 6, ТП 8 направляються на знешкодження. Проводять знезараження стерильного повітря від біосинтезу, конденсату та фугату культуральної рідини, промислових стоків, партій бракованого препарату тощо. Промивні дезінфікуючі розчини, залишки розчинів після санітарної обробки виробництва та відпрацьовану воду направляють до збірника нейтралізації стічних вод.

Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, рукавичок, упаковочних матеріалів, бракованих флаконів, пробок та ковпачків утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ 13. Переробка відходів та викидів. Промивні води та відпрацьоване повітря направляються на переробку.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс виробництва препарату стрептофунгін складений із урахування, що для процесу біосинтезу використовується ферментер об'ємом 3,2 м³ і з коефіцієнтом заповнення 0,55, у якому можна культивувати 1800 л

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

рідини; концентрація біомаси продуценту *S. albus* UN 44 у культуральній рідині складає 35 г/л. [22]

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробництва

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів або втрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР 4	Соєве борошно	14,69			ДР 4	Поживне середовище			1800
	Меляса	36,72				Втрати 2%			36
	NaCl	25,74							
	KH ₂ PO ₄ ×3H ₂ O	3,67							
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	10,65							
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	0,073							
	Пропінол Б-400	0,026							
	Вода питна			1744,43					
	Всього			1836		Всього:			1836

ДР 5	Поживне середовище			85,5	ДР 5	Посівний матеріал для ферментеру			90
	Посівний матеріал для інокулятора			4,5					
	Всього			90,0		Всього			90,0
ТП 6	Поживне середовище			1710	ТП 6	Культуральна рідина			1764
	Посівний матеріал			90		Втрати 2%			36
	Всього			1800		Всього:			1800
ТП 7	Культуральна рідина			1764		Суспензія біомаси			150
						Фугат			1596
						Втрати 1%			18
	Всього			1764		Всього			1764
ТП 8	Суспензія біомаси			150	ТП 8	Волога біомаса	80,5		
						Вода	68		
						Втрати 1%			1,5
	Всього:			150		Всього:			150
ТП 9	Волога біомаса	80,5			ТП 9	Суха біомаса	64,00		
						Вода			14,5
						Втрати 2%	2,0		
	Всього	80,5				Всього	80,5		
ТП 10	Суха біомаса	64,00			ТП 10	Гранульована біомаса	75,6		
	Цеоліт	12				Втрати 0,5%	0,4		
	Всього	76				Всього	76		

ТП 11	Гранульована біомаса	75,6			ТП 11	Фасований препарат (3 кг/мішок)	75	25	
	П/е мішки		25			Втрати 0,08 %	0,6		
	Всього	75,6	25			Всього	75,6	25	

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3. Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Кт	Запиленість приміщення	Візуально	Кожну операцію	Мінімальна
ДР 1.3 Підготовка виробничих приміщень Км	Вміст мікроорганізмів у повітрі	Методами мікробіологічного аналізу	Кожну операцію	Кількість м/о ≤ 500 од/м ³ ,
ДР 2.1. Мийка обладнання та комунікацій Кт	Забрудненість обладнання і комунікацій	Візуально	Кожну операцію	Мінімальна
ДР 2.1. Стерилізація обладнання та комунікацій Км	Вміст мікроорганізмів у обладнанні та комунікаціях	Методами мікробіологічного аналізу	Кожну операцію	Кількість м/о ≤ 10 од/см ³
ДР 4.1. Приготування поживного середовища Кх	Поживне середовище, рН	Візуально за датчиком	Протягом процесу	7,8-8,2
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт	Поживне середовище, температура	Пірометр	Кожну операцію	125 С
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт	Поживне середовище, тиск	Манометр	Протягом процесу	0,05 МПа
ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт	Поживне середовище, час витримування	Годинник	Кожну операцію	15 хв

ДР 4.2. Стерилізація поживного середовища Кт	Поживне середовище, температура	Пірометр	Протягом процесу	27-29 С
ДР 5.1. Відновлення музейної культури Кт	Посівний матеріал, температура	Термометр	Кожну операцію	27-29 С
ДР 5.1. Відновлення музейної культури Кт	Посівний матеріал, час вирощування	Календар	Кожну операцію	7 діб
ДР 5.1. Відновлення музейної культури Км	Посівний матеріал, мікробіологічна чистота	Методами мікробіологічного аналізу	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
ДР 5.2. Розмноження культури на колбах Кт	Посівний матеріал, температура	Термометр	Протягом процесу	27-29 С
ДР 5.2. Розмноження культури на колбах Кт	Посівний матеріал, час культивування	Календар, годинник	Кожну операцію	48 годин
ДР 5.3. Вирощування в інокуляторі Кт	Посівний матеріал, температура	Пірометр	Протягом процесу	27-29 С
ДР 5.3. Вирощування в інокуляторі Кх	Посівний матеріал, рН	Візуально за датчиком	Протягом процесу	7,8-8,2
ДР 5.3. Вирощування в інокуляторі Кт	Посівний матеріал, час культивування	Календар, годинник	Кожну операцію	48 годин
ДР 5.3. Вирощування в інокуляторі Кт	Посівний матеріал, інтенсивність перемішування	Тахометр	Протягом процесу	300 об/хв
ТП 6. Виробничий біосинтез Кт	Культуральна рідина, температура	Пірометр	Протягом процесу	27-29 С

ТП 6. Виробничий біосинтез Кх	Культуральна рідина, рН	Візуально за датчиком	Протягом процесу	7,8-8,2
ТП 6. Виробничий біосинтез Кт	Культуральна рідина, час культивування	Календар, годинник	Кожну операцію	96-120 годин
ТП 6. Виробничий біосинтез Кт	Культуральна рідина, інтенсивність перемішування	Тахометр	Протягом процесу	300 об/хв
ТП 7. Відділення біомаси центрифугуванням Кт	Культуральна рідина, кількість обертів	Візуально за датчиком	Протягом процесу	3 000 об/хв
ТП8. Концентрування суспензії вакуум-випаровуванням Кт	Суспензія біомаси, тиск	Манометр	Протягом процесу	0,03 МПа
ТП 8. Концентрування суспензії вакуум-випаровуванням Кт	Суспензія біомаси, температура	Термопара	Протягом процесу	40 С
ТП 9. Вишусування препарату Кт	Волога біомаса, температура	Термопара	Протягом процесу	200 С – вхідна температура, 70 С- вихідна температура
ТП 9. Вишусування препарату Кт	Волога біомаса, тиск	Манометр	Протягом процесу	0,5 МПа
ТП 11. Фасування Кт	Готовий препарат	Ваги, дозатор	Протягом процесу	3 кг в 1 п/е мішку
ЗВ 12. Знешкодження відходів та викидів Кх	Відпрацьовані розчини, рН	Індикатор на бумага	Кожну операцію	рН = 7

5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Посівний матеріал *S. albus UN 44*, що подають у інокулятор для засіву підготованого поживного середовища, вирощують попередньо в окремих апаратах – на колбах Ерленмейера на 750 мл, у кожній по 100 мл середовища. Засіяні колби вирощують на гойдалці 220-240 об/хв протягом 18-23 год. Загалом, необхідно 45 колб на качалках для засіву інокулятора.

Тип обладнання – інокулятора чи ферментера – для кожного біотехнологічного процесу вибирають з урахуванням специфіки продуцента, властивостей середовища і економічних міркувань. На стадії нарощування біомаси *S. albus UN 44* біореактор має бути обладнаний мішалкою і барботером для кращого перемішування вмісту реактора та достатньо інтенсивній аерації.

При вирощуванні біомаси в рідких поживних середовищах застосовують апарати, в яких передбачене інтенсивне перемішування середовища. Відомі різні варіанти ферментаторів, найбільше розповсюдження отримав ферментер з механічною мішалкою та підводом повітря через барботер, має рубашку чи змієвик для підводу або відводу тепла. Серед механічних мішалок в апаратах застосовують лопатеві, турбінні та пропелерні мішалки. Відомі також ферментери з пневматичним перемішування разом з аеруванням. Для підводу повітря в культуральне середовище застосовують барботер чи форсунки. До конструкції ферментаторів та інокуляторів виставляють високі потреби у відношенні герметичності. Сварка швів має бути щільна. Виділення вологи на

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Тарасюк А.Д.			РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		
Консульт.		Фесенко С.І.					
Керівник		Тодосієвич Т.С.					
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	58	92
					КПІ імені Ізгоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

зварних швах при гідравлічних випробовуваннях не допускається, так як це може призвести до контамінації культурального середовища. Необхідно також забезпечити щільність сальнику робочого валу апарату, прокладок люків та фланцевих з'єднань. Апарат виготовляють з нержавіючої або двошарової сталі.

Для попередження потрапляння в апарат контамінантів під час вирощування культури в процесі роботи під кришкою апарату надлишковий тиск має становити 0,15-0,25 кг/см²

Апарати з механічним перемішуванням – найпоширеніша конструкція в сучасній мікробіологічній промисловості. Вони мають механічну мішалку, що складається із центрального вала й лопат різної форми. Мішалка – рухомий робочий орган механічного перемішуючого пристрою, який здійснює безпосередню дію на рідке середовище. В систему перемішування входять також відбивні перегородки – вузькі металеві пластини, прикріплені до внутрішніх стінок реактора. Ці перегородки запобігають виникненню виру навколо обертової мішалки, переводячи круговий рух рідини у вихровий, рівномірно розподілений по всьому об'єму. Перспективи подальшого застосування апаратів з механічним перемішуванням пов'язані з високою швидкістю масопередачі кисню й значною економією потужності.

Для вибору оптимальної мішалки розглянемо основні типи, що використовуються в біотехнологічній промисловості:

1. Лопатеві. Ці мішалки рекомендується застосовувати при перемішуванні з метою суспендування, розчинення й при проведенні хімічних реакцій. Вони прості за конструкцією, але працюють недостатньо інтенсивно. Як правило лопатеві мішалки низькооборотні, з двома лопатками. Ці мішалки використовуються, коли немає необхідності в інтенсивній радіально – осьовій циркуляції рідини в апараті. Основними перевагами лопатевих мішалок є їх простота, а також низька вартість, в тих випадках, коли матеріал не являється визначаючим в загальній вартості їх виробництва. Широко використовуються

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

в процесах перемішування з одночасним нагріванням і охолодженням різноманітних напівтвердих мас, паст, замазок, а також для перемішування сипких, волокнистих та інших матеріалів в промисловості пластичних мас.

2. Якірні. Цей тип мішалок доцільно застосовувати для інтенсифікації теплообміну й запобігання випадіння осаду на стінках і днищі апарата.

3. Рамні мішалки використовують у випадках, коли необхідно забезпечити більше інтенсивне перемішування по висоті, а також при перемішуванні в'язких рідин у великому об'ємі.

4. Турбінні мішалки використовують у всіх випадках, коли необхідно інтенсивне перемішування, особливо рідин, що значно розрізняються по в'язкості, а також при диспергуванні газу в рідині. Також їх використовують при розчиненні твердих кристалічних часток, емульгуванні рідин з великою різницею густин.

Турбінні мішалки мають лопатки. Якщо лопатки знаходяться в корпусі таким чином, що вони утворюють закриті канали подібні ротору центробіжного насосу, то таку мішалку називають закритою турбінною мішалкою. У відкритих мішалках лопатки не знаходяться в корпусі. Найбільш простою й високоефективною серед відкритих турбінних мішалок є мішалка з прямими лопатками, які розміщені радіально.

Для перемішування культуральної рідини та диспергування у ньому стельного повітря під час нарощування біомаси *S. albus* UN 44 було обрано відкриту турбінну шестилопатевою мішалку. Перевагами обраної конструкції мішалки є менша маса порівняно з рамною та пропелерною. Менша вартість порівняно з іншими перемішувачами пристроями. Якщо розглядати пропелерну та турбінну мішалку за однаковими діаметрами та частотою обертів, що мають різну витрату потужності, у пропелерної вона є меншою. Отже, враховуючи, що ферментер з турбіною мішалкою є кращим по більшості характеристик, то доцільно використовувати даний варіант.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

Інокулятор складається з корпусу 2, еліптичного днища 6 та кришки 1, всередині розташований перемішуючий пристрій 5, що закріплений на валу 4. Посівний ферментер оснащений сорочкою 3 для відведення тепла при подачі води. При вирощуванні мікроорганізмів необхідно підтримувати температуру середовища на рівні 28 °С подачею охолоджуючої води з температурою 23 °С в сорочку ферментера. Схематичне зображення інокулятора для виготовлення препарату стрептофунгін зображене на рисунку 5.1.

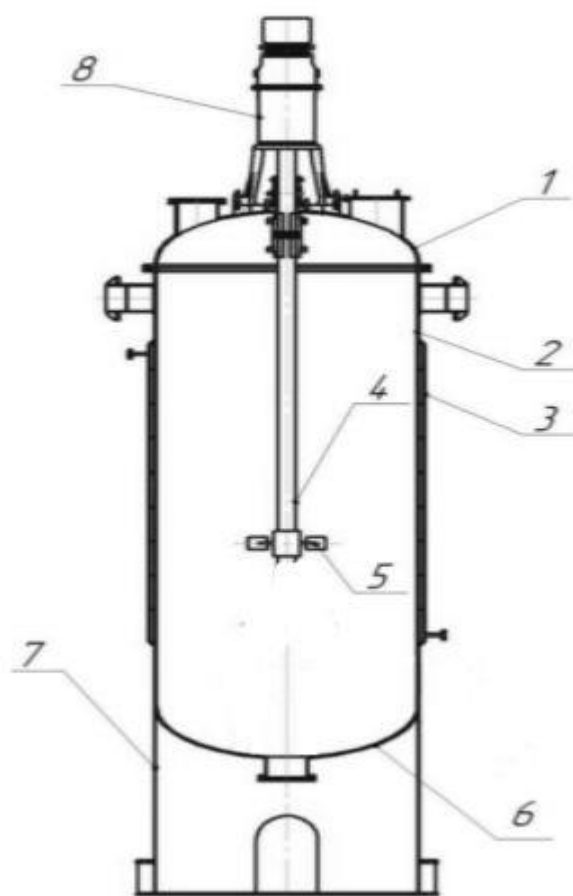


Рис. 5.1. Схематичне зображення інокулятора

1 – кришка; 2 – корпус; 3 – оболонь; 4 – вал; 5 – перемішуючий пристрій; 6 – днище; 7 – опора, 8 – привід.

Технічна характеристика

1. Апарат призначено для вирощування посівного матеріалу для виробництва стрептофунгіну.

2. Робочий об'єм, 0,09 м³

3. Тип перемішуючого пристрою – мішалка відкрита турбінна шестилопатева.

4. Кількість мішалок 1

5. Кількість відбивних перегородок 4

6. Частота обертання вала мішалки, 5 с⁻¹

7. Потужність електродвигуна 1,5 кВт.

8. Габаритні розміри:

– ширина

660 мм;

– довжина

690 мм;

– висота

1191 мм.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

У системі виробництва препарату стрептофунгін інокулятор (посівний апарат) використовують для нарощування біомаси *Streptomyces albus* UN 44 перед засіванням культури у основний ферментер для проведення процесу виробничого біосинтезу.

Реалізація біотехнологічних процесів з дотриманням асептичних умов розрахована на використання автоматизованого забезпечення. Крім того, для проведення процесу в асептичних умовах необхідне проведення додаткових стадій, що забезпечують стерилізацію поживних середовищ і повітря, що подається у інокулятор.

Приготоване і простерилізоване поживне середовище поступає в інокулятор, після чого засівається з дотриманням правил асептики через спеціальний пристрій посівним матеріалом, який попередньо був вирощений в колбах Ерленмейєра.

При досягненні необхідних стадій розвитку і кількості біомаси посівний матеріал передавляють стерильним повітрям по посівному колектору у ферментер, в якому відбувається виробниче культивування. Культивування посівного матеріалу в інокуляторі відбувається при заданому температурному режимі, аерації, перемішуванні і рН культуральної рідини. Таким чином метою використання інокуляторів є отримання посівного матеріалу.

Інокулятор будь-якої конструкції має задовольняти основним потребам процесу культивування клітин: забезпечити термостатування мікробної суспензії до кожної точки ферментаційного середовища; забезпечити підтримку оптимальних робочих параметрів в кожній точці робочого об'єму, забезпечити необхідний рівень перемішування та аерації, забезпечити високий рівень автоматизації процесу культивування, техніки безпеки та умов праці операторів.

Для розрахунку матеріального балансу ферментеру-інокулятору необхідно визначити його робочий розмір

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

$$V_p = 0,09 \text{ м}^3$$

Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу:

$$V_p = V_{nc} + V_{nm}$$

$$V_{nc} = 0,95 \cdot V_p = 0,95 \cdot 0,09 = 0,086 \text{ м}^3;$$

$$V_{nm} = 0,05 \cdot V_p = 0,05 \cdot 0,09 = 0,0045 \text{ м}^3.$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$\rho_{кр} = \rho_{nc} = \rho_{nm} = 1060 \frac{\text{кг}}{\text{м}^3};$$

$$M_{nc} = \rho_{nc} \cdot V_{nc} = 1060 \cdot 0,086 = 91,16 \text{ кг};$$

$$M_{nm} = \rho_{nm} \cdot V_{nm} = 1060 \cdot 0,0045 = 4,77 \text{ кг};$$

$$M_{кр} = \rho_{кр} \cdot V_{кр} = 1060 \cdot 0,09 = 95,4 \text{ кг}.$$

Матеріальний баланс ферментеру:

$$M_{кр} = M_{nc} + M_{nm} = 91,16 + 4,77 = 95,93 \text{ кг}$$

Конструктивний розрахунок виконується для визначення розмірів інокулятора та основних конструктивних елементів.

Загальний об'єм апарату розраховуємо за формулою:

$$V_H = \frac{V_p}{K_3} = \frac{0,09}{0,6} = 0,15 \text{ м}^3 \approx 0,16 \text{ м}^3.$$

Було обрано цільнозварний апарат з еліптичним днищем та кришкою (тип 1). За ГОСТ 20680–86 приймаємо внутрішній діаметр апарату [57]:

$$D_{вн} = 600 \text{ мм} = 0,6 \text{ м}.$$

Розрахуємо днище апарату. Висота еліптичної частини днища:

$$h_{ел.дн} = 0,25 \cdot D_{вн};$$

$$h_{ел.дн} = 0,25 \cdot 600 = 150 \text{ мм} = 0,15 \text{ м}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату [58]:

$$\text{внутрішня поверхня еліптичного днища :} \quad F = 0,44 \text{ м}^2$$

$$\text{висота відбортової частини:} \quad h_1 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м}$$

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

товщина стінки еліптичного днища :

$$S_{\text{дн}} = 4 \text{ мм} = 0,004 \text{ м}$$

об'єм еліптичного днища :

$$V_{\text{дн}} = 35,2 \text{ дм}^3 = 0,0352 \text{ м}^3$$

маса днища :

$$m_{\text{дн}} = 13,9 \text{ кг}$$

Повна висота еліптичного днища:

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_{\text{ел.дн}} = 0,025 + 0,15 = 0,175 \text{ м.}$$

Наступний розрахунок проводимо за методикою [59].

Повний об'єм апарату:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}},$$

звідки об'єм циліндричної частини реактора:

$$V_{\text{ц}} = V_{\text{н}} - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 0,16 - 2 \cdot 0,0352 = 0,0896 \text{ м}^3.$$

Висота циліндричної частини реактора:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{0,0896 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,6^2} = 0,317 \text{ м.}$$

Висота рівня рідини в циліндричній частині апарату:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4(V_{\text{р}} - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{4(0,09 - 0,0352)}{3,14 \cdot 0,6^2} = 0,194 \text{ м.}$$

Висота стовпа рідини в реакторі:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{рц}} + h_{\text{дн}} = 0,194 + 0,175 = 0,369 \text{ м.}$$

Загальна висота реактору без штуцерів та опор:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} = 0,317 + 2 \cdot 0,175 = 0,67 \text{ м.}$$

Далі необхідно провести розрахунок перемішуючого пристрою інокулятора. В якості пристрою для перемішування культуральної рідини в реакторі знаходяться турбінна шестилопатєва мішалка, схема якої зображена на рисунку 5.2.

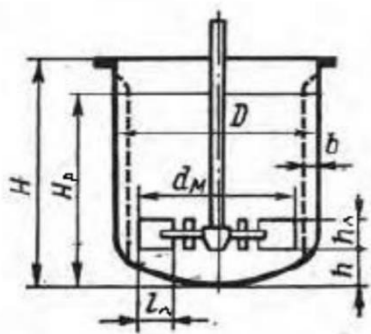


Рис. 5.2. Ескіз турбінної мішалки

Діаметр мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-85 [57]:

$$d_M = 160 \text{ мм}; \frac{D_{BH}}{d_M} = 3,75$$

Прийmemo стандартну турбінну мішалку діаметром 160 мм

Розрахуємо розміри мішалки [59]:

Висота лопаті:

$$h_l = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,16 = 0,032 \text{ м};$$

Ширина лопаті:

$$l_l = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м}.$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,5 \cdot d_M = 0,5 \cdot 0,16 = 0,08 \text{ м}.$$

Коефіцієнт гідравлічного опору мішалки:

$$\zeta_M = 8,4$$

Кутова швидкість турбінних мішалок при динамічній в'язкості середовища менше $10 \text{ Па} \cdot \text{с}$ складає від 2,5 до 10 м/с.

Розрахуємо кутову швидкість [60]:

$$\omega = \pi \cdot d_M \cdot n = 3,14 \cdot 0,16 \cdot 5 = 2,51 \frac{\text{м}}{\text{с}},$$

де n – частота обертання валу мішалки с^{-1} .

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розрахуємо глибину воронки.

Критерій Рейнольдса [60]:

$$Re_{вц} = \frac{n \cdot d_m^2 \cdot \rho_p}{\mu_p} = \frac{5 \cdot 0,16^2 \cdot 1060}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 8,75 \cdot 10^4;$$

де ρ_p – густина культуральної рідини в реакторі $кг/м^3$; μ_p – коефіцієнт динамічної в'язкості $Па \cdot с$.

Параметр висоти завантаження γ [59]:

$$\gamma = \frac{8 \cdot H_p}{D_{вн}} + 1 = \frac{8 \cdot 0,369}{0,16} + 1 = 19,45;$$
$$E = \frac{\gamma}{\zeta_m \cdot z \cdot Re_{вц}^{0,25}} = \frac{19,45}{8,4 \cdot 1 \cdot (8,75 \cdot 10^4)^{0,25}} = 0,124;$$

де ζ_m – критерій опору; z – кількість мішалок на валу (1) шт.

Глибина воронки в реакторі без відбиваючих перегородок [60]:

$$H_v = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2} = \frac{4 \cdot 5^2 \cdot 0,16^2}{2} = 1,28 \text{ м};$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми [60] в залежності від E і типу мішалки.

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{\text{доп}} = H_p - h = 0,369 - 0,16 = 0,21 \text{ м}.$$

Так як глибина воронки вище допустимого значення, необхідне встановлення відбиваючих перегородок.

Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування визначають за формулою: [60]

$$N = K_N \cdot \rho_c \cdot n^3 \cdot d_m^5$$

де K_N – критерій потужності, що залежить від інтенсивності перемішування і характеризується центробіжним критерієм Рейнольдса. За графіком нормалі [59] знаходимо значення $K_N = f(Re_{ц})$:

$$K_N = 8$$

$$N = 8 \cdot 1060 \cdot 5^3 \cdot 0,16^5 = 111,14 \text{ Вт}$$

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

При розрахунку потужності привода мішалки необхідно врахувати потужність, що витрачається в ущільненні валу мішалки та на подолання опору внутрішніх пристроїв реактора. Потужність, що витрачається на тертя в ущільненнях вала мішалки залежить від діаметра вала d_e в місці ущільнення.

Для вибору торцевого ущільнення визначимо діаметр валу.

Значення d_v можна наближеним співвідношенням [60]:

$$d_v = C \cdot d_M = 0,117 \cdot 0,16 = 0,019 \text{ м},$$

$d_v = 0,04 \text{ м}$, як найближче стандартне число (ГОСТ 6533-78)

де коефіцієнт C вибирається залежності від конструкції мішалки. Для турбінної мішалки 0,117.

Оскільки торцеве ущільнення має високу герметичність у порівнянні з аналогами, високий ККД, високу зносостійкість, довговічність, добре працює при присутності биття валу, то обираємо його. Обираємо тип ущільнення подвійне з термічним затвором Т1 (ТТ) – для валів апаратів зі стерильними біологічними процесами.

Потужність приводу перемішуючого пристрою розраховується[59]:

$$N_{\text{ел}} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N + N_{\text{ущ}}}{\eta},$$

де коефіцієнт рівня рідини в апараті:

$$K_H = \left(\frac{H_p}{D}\right)^{0,5} = \left(\frac{0,369}{0,6}\right)^{0,5} = 0,78.$$

Де $K_n=1$ – в апараті з перегородками;

K_i – коефіцієнт, що враховує наявність в апараті внутрішніх пристроїв ($\sum K_i = 1,1(\text{термометр}) + 1,1(\text{манометр}) + 1,1(\text{тахометр}) = 3,3$);

N – потужність, що витрачається на перемішування; $N_{\text{ущ}}$ – потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки; η – ККД двигуна (0,85-0,9).

Потужність, що витрачається на подолання тертя в торцевому ущільненні розраховують по формулі:

$$N_{ущ} = 10440 \cdot d_{\epsilon}^{1,3} = 10440 \cdot 0,040^{1,3} = 159 \text{ Вт}.$$

Отже, потужність приводу перемішуючого пристрою:

$$N_{ел} = \frac{1 \cdot 0,78 \cdot 2,2 \cdot 111,14 + 159}{0,9} = 388,57 \text{ Вт}$$

За знайденим за формулою значенням $N_{ел}$ обираємо привід електричний багатооборотний з $N_{ел} = 1,5$ кВт та $n = 306 \text{ хв}^{-1}$ [61].

Конструктивний розрахунок кільцевого барботеру виконується відносно мішалки ферментеру. Схема взаємного розташування мішалки і барботеру наведена на рисунку 5.3.

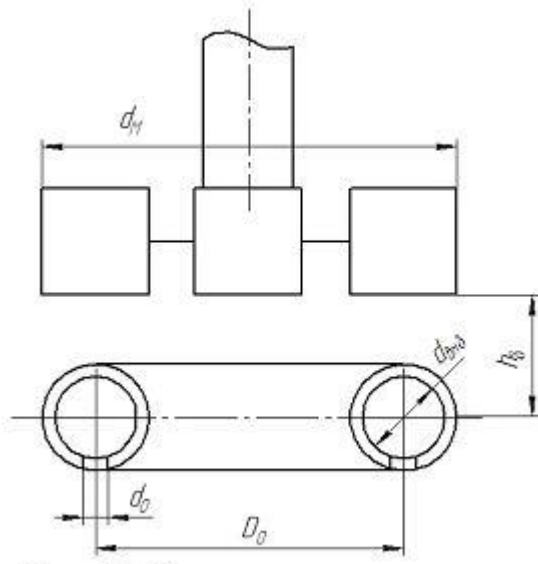


Рис 5.3. Схема взаємного розташування мішалки і барботеру

$$h_{\epsilon} = 0,25 d_{\text{міш}} = 0,25 \cdot 0,16 = 0,04 \text{ м}$$

$$D_0 = 0,5 \cdot d_{\text{міш}} = 0,5 \cdot 0,16 = 0,08 \text{ м}$$

$$d_0 = 2 \text{ мм} = 0,002 \text{ м}$$

Об'ємна витрата газу має складати 0,4 об'єми повітря від об'єму поживного середовища у хвилину, тобто:

$$v = 0,04 \cdot 0,09 = 0,036 \frac{\text{м}^3}{\text{хв}} = 0,0006 \text{ м}^3 \frac{\text{м}^3}{\text{с}}$$

Теплообмінні пристрої ферментера повинні забезпечувати підтримку певної температури протягом всього циклу. Метою теплового розрахунку є визначення теплового навантаження посівного інокулятора і поверхні теплообміну теплообмінних пристроїв апарату.

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в посівних апаратах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрій апарата, тобто сорочку.

Теплота, що підводиться до середовища в апараті (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу. Розрахунок ведемо за надходженнями та витратами теплової енергії. Теплофізичні властивості поживного середовища при визначальній температурі – $t_{cp} = 20^{\circ}\text{C}$.

$$c_{кр} = c_{пс} = c_{пм} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot x - t_{cp1});$$

$$c_{кр} = c_{пс} = c_{пм} = 4,073 - 0,00134 \cdot (14,4 \cdot 17 - 25) = 3,788 \cdot 10^3 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}.$$

Надходження енергії у ферментер для вирощування посівного матеріалу відбувається [62]:

1) з поживним середовищем

$$E_{пс} = M_{пс} \cdot C_{пс} \cdot t_{пс}$$

$$E_{пс} = 91,16 \cdot 3788 \cdot 20 = 6,906 \text{ МДж.}$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{пм} = M_{пм} \cdot C_{пм} \cdot t_{пм};$$

$$E_{пм} = 4,77 \cdot 3788 \cdot 20 = 0,361 \text{ МДж}$$

3) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішувачів пристроїв:

$$E_{дис1} = N_{уст} \cdot \tau_{пер};$$

$$E_{дис1} = 111,14 \cdot 172800 = 19,205 \text{ МДж}$$

Де N – потужність, що витрачається на перемішування Вт ; $\tau_{пер}$ – час перемішування, с .

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

4) теплота реакції

В поживному середовищі кількість сухих речовин становить [59]:

$$m_{\text{цук}} = 0,17 \cdot M_{\text{нс}} = 0,17 \cdot 91,16 = 15,49 \text{ кг},$$

з них 41,4% цукру, тобто 37,74 кг.

$$E_p = \frac{m_{\text{цук}} \cdot r_{\text{цук}}}{\tau_{\text{пр}}};$$

Де теплота згорання цукрів:

$$r_{\text{цук}} = \frac{21800}{0,18} = 1211111 \frac{\text{Дж}}{\text{кг}}.$$

Таким чином:

$$E_p = \frac{37,074 \cdot 1211111}{172800} = 0,000260 \text{ МДж}.$$

Сумарна кількість надходження теплоти у інокулятор:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{нс}} + E_{\text{нм}} + E_{\text{дис}_1} + E_p;$$

$$\sum E_{\text{надх}} = 6,906 + 0,361 + 19,205 + 0,000260 = 26,472 \text{ МДж}.$$

Витрати теплової енергії здійснюються [62]:

1) з культуральною рідиною:

$$E_k = M_k \cdot C_k \cdot t_k = \rho_k \cdot V_p \cdot C_k \cdot t_k;$$

де $t_k = 28^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

$C_k = 4070 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність культуральної рідини,

$\rho_k = 1085 \text{ кг/м}^3$ – густина культуральної рідини,

$$E_k = 1085 \cdot 0,09 \cdot 4070 \cdot 28 = 11,129 \text{ МДж}.$$

2) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot E_k$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot 11,129 = 0,222 \text{ МДж}.$$

3) втрати теплоти, що віділяється з повітрям:

$$E_{\text{п}} = \rho_k \cdot t_k \cdot \rho_{\text{п}} \cdot v \cdot \tau_{\text{пр}}$$

$$E_{\text{п}} = 1085 \cdot 28 \cdot 0,906 \cdot 0,0006 \cdot 172800 = 2,85 \text{ МДж}$$

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

Де v – швидкість повітря, 0,0006 м/с,

$\rho_{\text{п}}$ – густина повітря при 28 °C

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_{\kappa} + E_{\text{втр}};$$
$$\sum E_{\text{витрат}} = 11,129 + 0,222 + 2,85 = 14,201 \text{ МДж.}$$

Таким чином теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_m = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}}$$
$$E_m = 14,201 - 26,472 = -12,271 \text{ МДж.}$$

Тобто із системи необхідно відводити тепло [62].

$$Q = |E_{\text{т}}| = 15,121 \text{ МДж}$$
$$Q = M_{\text{т}} \cdot C_{\text{т}} \cdot (t_{\text{тп}} - t_{\text{тк}})$$

Звідки:

$$M_m = \frac{Q}{C_m \cdot \Delta t_m}$$

де $C_m = 4182 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_m = 4^{\circ}\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_m = \frac{12,271 \cdot 10^6}{4182 \cdot 4} = 733,56 \text{ кг.}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_m = \frac{M_m}{\tau_{\text{пр}}};$$
$$G_m = \frac{733,56}{172800} = 0,005 \frac{\text{кг}}{\text{с}}$$

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія [59]

де, $\Delta t_{\text{ср}} = 4^{\circ}\text{C}$.

Тоді:

$$t_{\text{mn}} = 23^{\circ}\text{C};$$

$$t_{\text{mk}} = 27^{\circ}\text{C};$$

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

$\delta_{\text{ст}} = 0,001 \text{ м}$ – товщина стінки,

$D_c = 0,65 \text{ м}$ – діаметр сорочки ферментера.

Певні розміри відносно діаметрів ферментера [62]: $a = 0,015 \text{ м}$;

$b = 0,1 \text{ м}$.

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{4ab}{2(a+b)}$$

$$d_{\text{екв}} = \frac{4 \cdot 0,0015}{2(0,015 + 0,1)} = 0,026 \text{ м}.$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{\text{ср}} = D_c - a$$

$$D_{\text{ср}} = 0,65 - 0,015 = 0,635 \text{ м}.$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у посівному апараті та коефіцієнт теплопередачі.

Для розрахунку коефіцієнту тепловіддачі від середовища до стінки визначаємо:

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння [63]:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \cdot Fr_c^{0,1} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{\text{ст}}} \right)^{0,14}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{\rho_c \cdot n \cdot d_{\text{м}}^2}{\mu_c}$$

$$Re_c = \frac{1060 \cdot 5 \cdot 0,16}{1,55 \cdot 10^{-3}} = 547,1 \cdot 10^3.$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c}$$

$$Pr_c = \frac{1,55 \cdot 10^{-3} \cdot 3788}{0,521} = 11,27$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{n^2 \cdot d_m}{g};$$

$$Fr_c = \frac{(5^2 \cdot 0,16)}{9,81} = 0,4077.$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (547,1 \cdot 10^3)^{0,59} \cdot 11,27^{0,38} \cdot 1 \cdot 0,4077^{0,1} = 7523,39$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

$$\alpha_c = \frac{Nu_c \lambda_c}{D}$$

$$\alpha_c = \frac{7523,39 \cdot 0,521}{0,6} = 6532,81 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Теплофізичні властивості теплоносія [21]:

$$\rho_m = 997,0 \frac{кг}{м^3};$$

$$C_m = 4179 \frac{кДж}{кг \cdot К};$$

$$\lambda_m = 0,609 \frac{Вт}{м \cdot К};$$

$$\vartheta_m = 532,27 \frac{м^3}{с}.$$

Коефіцієнт тепловіддачі теплоносія в сорочці визначають з наступної формули [63]:

$$\alpha_m = \alpha_{m1} \left(1 + 3,54 \frac{d_{екв}}{D_{cp}}\right).$$

α_{m1} визначаємо з формули:

$$\alpha_{m1} = \left(\frac{Nu_m \cdot \lambda_m}{d_{екв}}\right) = \frac{1,056 \cdot 0,609}{0,026} = 24,75 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}.$$

Критерій Нуссельта розраховуємо за формулою:

$$Nu_T = 0,008 \cdot (Re_m^{0,9} \cdot Pr_m^{0,43}) = 0,008 \cdot 96,02^{0,9} \cdot 6,17^{0,43} = 1,056.$$

Відповідно швидкість теплоносія:

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

$$W_m = \frac{V_m}{a \cdot b} = \frac{0,000005}{0,015 \cdot 0,1} = 0,0033 \frac{м}{с}.$$

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_m = \frac{G_m}{\rho_m} = \frac{0,005}{997,0} = 0,000005 \frac{м^3}{с}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T \cdot d_{\text{екв}}}{\nu_T} = \frac{0,0033 \cdot 0,026}{0,906 \cdot 10^{-6}} = 96,02;$$

Критерій Прандтля:

$$Pr_m = \frac{\mu_c \cdot C_m}{\lambda_m}$$

$$Pr_c = \frac{0,9 \cdot 10^{-3} \cdot 4178}{0,609} = 6,17$$

Тоді:

$$\alpha_T = 24,75 \cdot (1 + 3,54 \frac{0,026}{0,635}) = 50,32 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{1}{\alpha_T}};$$

де $\lambda_{\text{ст}} = 17 \frac{Вт}{м \cdot К}$ – теплопровідність стінки,

$$K = \frac{1}{\frac{1}{6532,81} + \frac{0,001}{17} + \frac{1}{50,32}} = 49,75 \frac{Вт}{м^2 \cdot К}$$

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}}$$

$$\Delta t_6 = 28 - 27 = 1^\circ C;$$

$$\Delta t_M = 28 - 23 = 4^\circ C.$$

$$\Delta t_{\text{ср}} = \frac{\Delta t_6 - \Delta t_M}{\ln \frac{\Delta t_6}{\Delta t_M}} = 2,485^\circ C$$

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

$$F_p = \frac{12,271 \cdot 10^6}{49,75 \cdot 2,485 \cdot 172800} = 0,57 \text{ м}^2.$$

Розрахована площа теплообміну має бути меншою за дійсну площу, яку забезпечує даний теплообмінник.

$$F_p < F_d$$

За ГОСТ 9931-85 допустима площа за заданого об'єму та діаметру є рівною $0,9 \text{ м}^2$.

Умова теплообміну виконується, оскільки $0,59 < 0,9 \text{ м}^2$, а отже обраний інокулятор забезпечує необхідну температуру протягом його роботи без додаткових теплообмінних пристроїв. Належний тепловий режим забезпечується підведенням охолоджуючого теплоносія в сорочку.

Для визначення гідравлічного опору сорочки теплообміну необхідно розрахувати коефіцієнти гідравлічного опору для теплоносія.

$$\xi_1 = 17/Re_1^{0,25} = 17/96,02^{0,25} = 5,43$$

Розрахунок гідравлічного опору теплообмінника по потоку теплоносіїв:

$$\begin{aligned} \Delta P_1 &= \kappa_1 \cdot \xi_1 \cdot (L/d_{\text{екв}}) \cdot (\rho_1 \cdot w_1)/2 = 3 \cdot 5,43 \cdot (0,1/0,026) \cdot (997,0 \cdot 0,0033)^2/2 = \\ &= 338,96 \text{ Па} \end{aligned}$$

Основною задачею при гідравлічних розрахунках насосів є визначення необхідного напору і потужності двигуна при заданій витраті рідини. Вибір насосу проводиться за каталогами чи ГОСТами з урахуванням властивостей рідин, що переміщаються.

Необхідний напір насосу:

$$H_1 = \Delta P_1 / (\rho_1 \cdot g) = 338,96 / (997 \cdot 9,81) = 0,035 \text{ м}$$

Корисна потужність, що затрачується на переміщення середовища:

$$N_{n1} = \rho_1 \cdot g \cdot H_1 \cdot G / 1000 = 997 \cdot 9,81 \cdot 0,035 \cdot 0,005 / 1000 = 0,017 \text{ кВт}$$

Потужність, яку повинен розвинути електродвигун насоса на вихідному валу при установлених режимі роботи:

$$N_{\text{дв1}} = N \cdot n_1 / \eta_n = 0,017 / 0,6 = 0,028 \text{ кВт}$$

де $\eta_n = 0,6$ – коефіцієнт корисної дії для насоса середньої продуктивності.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

Потужність, яку споживає двигун від мережі при $\eta_{\text{дв}} = 0,7$

$$N_1 = N_{\text{дв1}} / \eta_{\text{дв}} = 0,028 / 0,7 = 0,04 \text{ кВт}$$

Враховуючи коефіцієнт запасу потужності $\beta=2$, встановимо двигун потужністю:

$$N_{\text{уст1}} = N_1 * \beta = 0,04 * 2 = 0,08 \text{ кВт}$$

За цими величинами обрано насос КМП 40-25-160 з потужністю 2,2 кВт (подачою 6,3 м³/год або 1,75 м³/с), напором 32 м за ГОСТ 22247-96. [64]

Вибір штуцерів та опор

За АТК 24.218.06-90 [65] обрано штуцера типу 1(із фланцями сталевими плоскими приварними на умовний тиск від 0,6 до 2,5 МПа), виконання 1(із з'єднуючим виступом на умовний тиск від 0,6 до 2,5 МПа). Для зручності з'єднання з трубопроводами приймаємо довжини вильоту рівними 120 мм. Діаметри штуцерів: штуцер для входу продукту, входу і виходу води, входу поживного середовища ($D_y = 40$ мм); штуцер технологічний ($D_y = 50$ мм); штуцер для виходу продукту ($D_y = 150$ мм); штуцер для входу посівного матеріалу, штуцер барботеру ($D_y = 40$ мм); штуцер для гільзи термометру. Приймаємо товщину стінок всіх штуцерів рівною 2 мм. Згідно ОН 26-01-33-66 приймаємо опори для вертикальних сталевих емальованих апаратів за $D_e = 600$ мм. [66]

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Насос з маркуванням КМП 40-25-160. призначений для подачі виробничо-технічних рідин і прісної води. Він забезпечує функціонування циркуляційних, водопостачальних, опалювальних систем. Технічні характеристики: потужність 2,2 кВт, подача 6,3 м³/год або 1,75 м³/с), напором 32 м. Маса насосу —46 кг.

Для проведення точного завантаження обладнання обраний об'ємно-ваговий дозатор ДОП-60, що дозволяє з високою точністю проводити завантаження сировини в автоматичному режимі.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		77

Електричний привід використовується для приведення в дію оборотного валу, на якому встановлено перемішуючий пристрій. MR102-90L - модель співвісного циліндричного мотор-редуктора промислового призначення для одержування обертів на виході 100 - 300 об/хв. Мотор-редуктор виготовляється в виконанні на лапах, фланцевому і комбінованому виконанні. Потужність такого електричного приводу складає 1,5 КВт.

Гойдалка для колб РОТАБІТ SELECTA виконує круговий і зворотно-поступальний рух за вибором. Регулювання швидкості від 20 до 230 коливань в хвилину, амплітуда коливань 15 або 20 мм. Гойдалка має цифровий дисплей, на якому відображається кількість обертів і температура навколишнього середовища.

Для контролю параметрів процесу виробничого процесу нарощування біомаси необхідне встановлення всередині інокулятора: температурного пірометра, тахометру для виміру кутової швидкості мішалки, манометру для виміру надлишкового тиску (електроконтактний ЕКМ-10. Діапазон вимірювання тиску: від 25 до 75 % діапазону показань. Діапазон показань: 0-2,5 МПа) та датчику рН(з платиновим ТСП термоперетворювачем опору, вих. сигнал: 4 – 20мА, діапазон вимірювання рН 0-14).

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

Науково-технічний прогрес ставить ряд нових проблем. Використання нових матеріалів, конструкцій і процесів, інновації в технічному оснащенні машинобудівних підприємств, збільшення швидкості і продуктивності машин впливають на характер і частоту нещасних випадків і захворювань на виробництві. Витрати на робочу силу на одиницю продукції знижуються за рахунок автоматизації виробництва, але з цим виник ряд проблем, пов'язаних з підвищеним психічним стресом для операторів і так далі. Небезпечними і шкідливими виробничими факторами при експлуатації і обслуговуванні лінії є:

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

- шум і вібрація; промислове освітлення;
- повітря робочої зони;
- електрична небезпека;
- пожежна безпека та надзвичайні ситуації

Людина, залучена в виробничий процес, потенційно схильна до різних типів небезпек, які можуть включати: контакт з хімічними і агресивними рідинами, високу температуру і тиск в пристроях і трубопроводах і багато іншого. Тому постійний контроль і суворе дотримання технологічної дисципліни, технологічних регламентів, дотримання норм і правил безпеки та виробничої санітарії - одне з гарантованих умов безпеки. Основними складовими охорони праці на виробництві є: безпечне виробниче обладнання; безпечні технологічні процеси; організація безпечного виконання робіт [67].

Вимоги безпеки до виробничого обладнання конкретних груп, типів, моделей розробляються відповідно до вимог ГОСТ 12.2.003-91 з урахуванням призначення, продуктивності і умов його експлуатації. Безпека виробничого обладнання забезпечується: вибором принципів дії, джерел енергії, параметрів робочих процесів; мінімізація споживаної або накопиченої енергії; використання вбудованих засобів захисту та інформації про можливі небезпечні ситуації; застосування автоматизації, дистанційного керування та моніторингу; обмеження фізичного і нервово-психічного стресу працівників.

Пристрої з пристроями для забезпечення безпечної експлуатації повинні відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003-91, ГОСТ 12.2.007.9-93 і конструкторської документації на влаштування цього типу. Для забезпечення дотримання вищевказаних вимог в розробленому апараті реалізована захист від високого тиску робочого середовища шляхом установки запобіжного клапана. Герметичність пристрою по відношенню до зовнішнього середовища забезпечується установкою ущільнення сальника і проведенням надійної електрозварювання і установкою пристрою, згідно з ГОСТ 24444-87. Пристрій

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

повинен бути оснащено захисним заземленням від небезпечних значень електричного струму, згідно ГОСТ 12.1.038-82. [67,68]

Протягом дня виробниче приміщення висвітлюється природним світлом. Він проникає через бічні отвори, розміри яких становлять 0,1×5,1 м, орієнтовані на північ і забезпечують коефіцієнт природного освітлення (КПО) не менше 1,5%. На вікнах є пристосування для відкривання, а також жалюзі. Штучне освітлення виконане у вигляді суцільних ліній світильників. Рівень освітленості повинен бути 300 Лк. Світлодіодні лампи потужністю 8 Вт зі світловим потоком 900 Лм відбираються для штучного освітлення. Кількість ламп становить 8 штук, тому освітленість становить 330 Лк, що відповідає вимогам ДБНВ 2.5.28-2006. Ми використовуємо систему вимикачів, вона дозволяє регулювати інтенсивність штучного освітлення.

Заземлювальні пристрої, призначені для захисту пристроїв від статичної електрики, повинні поєднуватися з заземлюючими пристроями для електричного обладнання. Температура зовнішніх поверхонь приладів або кожухів теплоізоляційних покриттів, доступних для дотику з робочого місця обслуговуючого персоналу. Рівень звуку і еквівалентний рівень звуку на робочих місцях поруч з пристроєм, який вимірюється за шкалою шумоміра, відповідно до вимог не повинен перевищувати 80 дБ. Форма проектного пристрою визначається технічною реалізацією і відображає естетичні уявлення про формування пристроїв цього типу. [69]

Згідно ДСТУ 2293-99, виробнича санітарія являє собою систему організаційних, гігієнічних і санітарних заходів і засобів запобігання впливу на працівників шкідливих виробничих факторів. Сфера промислової санітарії - це запобігання професійних небезпек, які можуть привести до професійних або професійним захворюванням, в тому числі смертельним в результаті таких факторів, як випромінювання електромагнітних полів, іонізуюче випромінювання, шум, вібрація, хімічні речовини і т. д. [70]

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

Велика увага в виробництві приділяється профілактиці професійних захворювань. Виробництво повинно регулярно і суворо контролюватися на наявність токсичних та хімічних речовин в повітрі. Несприятливі умови можуть виникнути в виробничих приміщеннях через недотримання оптимальних параметрів вологості, температури, швидкості повітря, збільшене тепловиділення, викликане поганою вентиляцією або надмірним тепловим випромінюванням від пристрою. Ці фактори знижують працездатність і працездатність персоналу, підвищують стомлюваність і потовиділення, втрачається втрата тканин і виникає стан надмірної втоми.

Створення оптимальних параметрів досягається за рахунок автоматизації процесів кондиціювання і вентиляції всіх відділень приміщення. Тепловипромінюючі пристрої повинні бути покриті відповідними теплоізоляційними матеріалами. Якщо неможливо усунути всі дестабілізуючі фактори працівників, необхідно використовувати солону газовану воду для підтримки ефективності працівників. Тільки працівники, які пройшли інструктаж з техніки безпеки і мають досвід роботи з обладнанням, можуть працювати. Роботи слід виконувати тільки на справному обладнанні з кришкою на обертових компонентах і при заземленні обладнання. Відповідно до робочого регламенту періодично перевіряється відповідність реальних показників встановленим нормам.

Безпека умов праці також залежить від термінів проведення планових ремонтів, зовнішнього і внутрішнього огляду приміщень, огляду обладнання при планових і капітальних ремонтах. Відстрочка планових ремонтів неприпустима. Така недбалість часто призводить до жаклих обставин, які легше запобігти, ніж усунути.

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		81

ВИСНОВКИ

1. В проєкті для виробництва препарату для захисту рослин від фітопатогенів стрептофунгін в обрано продуцент *Streptomyces albus UN 44*.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів та запропоновано схему отримання продуценту шляхом трьохступінчастої послідовної обробки мутагенами у встановлених ефективних дозах: N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном (30мг/мл, 2 год), ультрафіолетовим випромінюванням (240 Дж/м², α = 254-255 нм) і нітратною кислотою (0,5 М HNO₃, 50 хв.)

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *S. albus UN 44*. обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі м'яси та соєвого борошна, а також визначені раціональні параметри культивування: температура 28±1°C, перемішування при 300 об/хв, тривалість 96-120 год, аерація 0,4 V_{пов}/V_{ПС}×м³/хв, рН середовища 7,8-8,2.

4. Відповідно до визначених біологічних характеристик продуценту для його культивування обраний і розрахований апарат інокулятор, який дозволяє отримати посівний матеріал у необхідній кількості (0,09 м³ культуральної рідини).

5. Запропоновано використання цеоліту в якості інертного носія та стабілізатору препарату біомаси живих клітин, що обумовлює підвищення його стабільності та активності, а також додаткову сорбційну здатність, наприклад, щодо води.

6. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва препарату стрептофунгін для рослинництва в поліетиленових пакетах по 3 кг.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Тарасюк А.Д.			ВИСНОВКИ	Стадія	Аркуш
Консульт.						Д	82
Керівник		Тодасіичук Т.С.				КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
							92

ДОДАТОК А

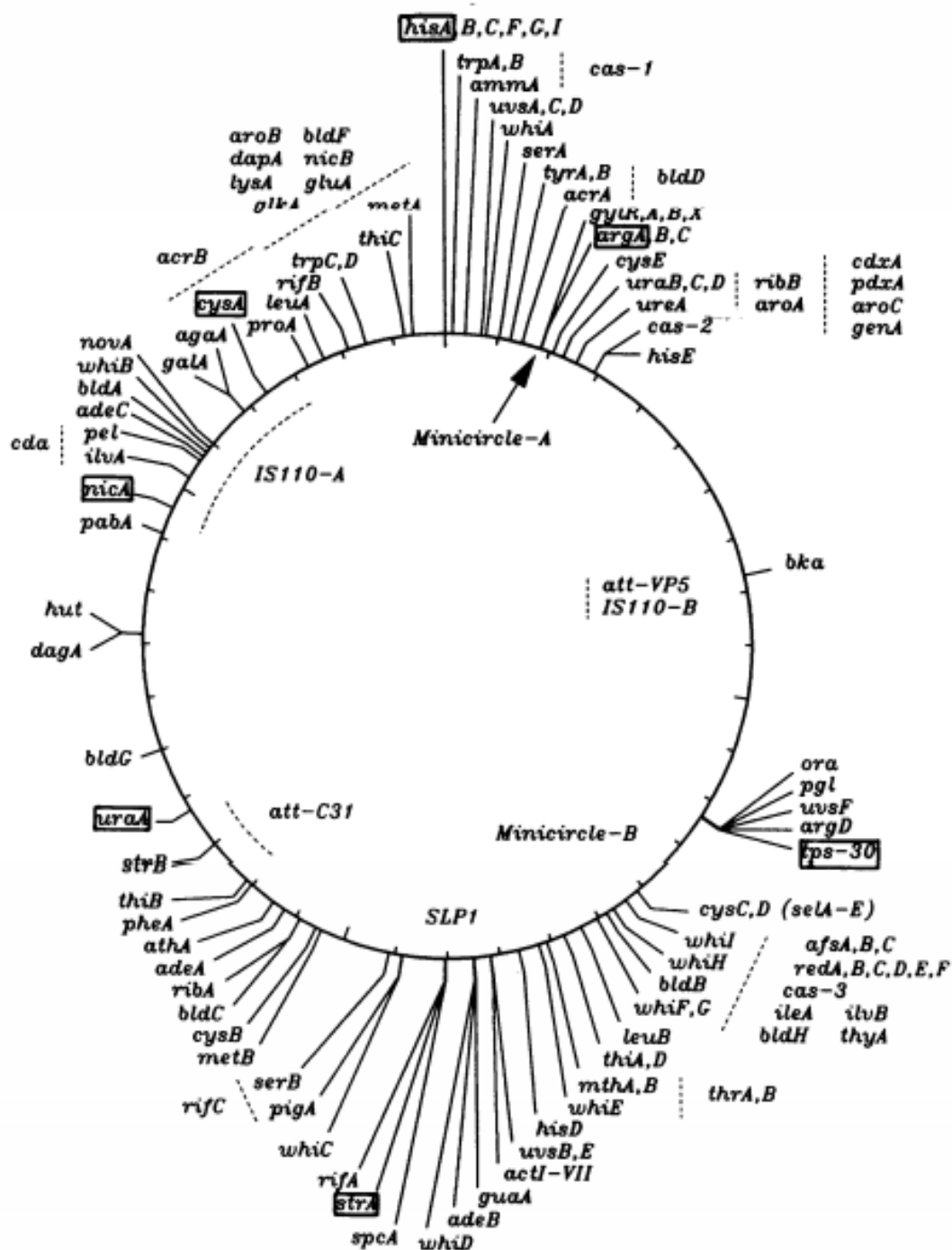


Рис. А.1. Генетична карта *S. Coelicolor*. Сім символів (hisA, argA, tps-30, strA, ugaA, nica та cysA) – це маркери, які використовуються для оцінки відстані на карті від ймовірності меродиплоїдії(часткової диплоїдії) в гетероклонах.

					ДП 6217. 00.000.00 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДОДАТОК А		
Розробив	Тарасюк А.Д.						
Консульт.							
Керівник	Тодосіюк Т.С.						
					Стадія	Аркуш	Архів
					Д	90	92
					КПІ імені Ігоря Сікарського Каф. ПБТ Гр. БТ-62		

Таблиця А.1. Генетичні маркери, та клони, що використовувались при створенні генетичної карти.

Маркер	Фрагменти з гібридизацією маркеру		Клон і опис
	AseI	DraI	
abaA	F	— ^a	pIJ2344 (pIJ486, що несе 20-kb MboI частковий фрагмент
actb	N	—	pIJ2345 (pBR329, що несе 2.2-kb BamHI фрагмент [сайти 14-17] з регіону actI)
	N+K	—	A 1.6-kb SalI фрагмент (сайти 11.8-13.3) включаючи actII-ORF4 та наступні послідовності
	D	—	pIJ2334 (pBR329, що несе 6-kb BamHI франмент [сайти 10-13])
afsR	D	D	pUC19, що несе 2.5-kb PstI-BclI фрагмент, включаючи C-кінець
afsQ	K	D	pUC19, що несе 854-bp PstI-BamHI фрагмент, включаючи N-кінець та наступні послідовності
argA ^b	L	H	pIJ916, що несе -15-kb MboI частковий фрагмент
argG	A	A ^c	pMCP25 (pIJ702, що несе -2-kb BglII фрагмент)
argX	M	—	pLUS317 [pBluescript KS(-), що несе 5.6-kb Sau3AI (частковий) фрагмент Streptomyces lividans ДНК]
bldA ^b	E	—	pIJ2152 (pBR222a, що несе 5.6-kb PstI) фрагмент)
bldB ^b	B	C	pNZBZ (pUC8, що несе 4-kb PstI фрагмент)
"bldX"	D	B ^c	pKK301 (pUC18, що несе -600-bp BamHI фрагмент)
cutR/S	B	C	pLUS120 [pBluescript KS(+), що несе 1.7-kb PstI фрагмент з cutR та частиною cutS)

cysC/D ^b	B	C	pIJ981 (pIJ2926, що несе весь 11-kb інсерт pIJ973)
"dnaA"	H	B	FF904 (EMBL4, що несе фрагмент of Streptomyces lividans ДНК, що гібридизовано до Pseudomonas putida dnaA)
glkA	C	E	pIJ2420 (pIJ2925, що несе 2.9-kb BclI фрагмент)
glnR	E	—	pLEW203 [pBluescript SK(+), що несе 1.5-kb BamHI-StuI фрагмент з pLEW177]
gyl ^b	I	H	pIJ2926, що несе 2.9-kb SstI фрагмент з pIJ2116
hisA ^b	C	E	pIJ63 (pIJ2925, що несе 3.4-kb EcoRI-HindIII фрагмент)
hisD ^b	B	F	pIJ2925, що несе 4.6-kb фрагмент
IS117-A ^b	I+L	H	pIJ4210 (pBR327, що несе клоновану копію IS117 круглу форму [as a HindIII fragment])
IS117-B ^b	A+B	C	
Pgl	A	A	2 сусідніх BamHI фрагменти (5 and 10 kb) pIJ5500 (pIJ922 що несе 16-kb Sau3AI 56 [частковий] фрагмент)
proA ^b	C	G	pIJ916, що несе 13.5-kb MboI (частковий) фрагмент
P _{TH4}	E	B ^c	pIJ4470 (pIJ4083, що несе 230-bp Sau3AI фрагмент)
P _{TH70}	C	G	pIJ4471 (pIJ4083, що несе 750-bp Sau3AI фрагмент)
red ^B	B	C	pIJ2356 (pIJ486, що несе 13-kb MboI фрагмент)
sapA	F	—	498-bp NarI фрагмент
SLP1 ^b	D	D	SLP1.2 з M180
trpB	C	E	pDHT7 (pBR329, що несе 1.1-kb SphI фрагмент)
whiB ^b	E	—	pIJ2157 (pIJ698, що несе 5.7-kb BclI фрагмент)
whiE ^b	B	F	pIJ2156 (pIJ922, що несе 7.9-kb Sau3AI (частковий) фрагмент)
whiG ^b	B	F	pIJ4400 (pIJ2921, що несе 5.8-kb XhoI-SstI фрагмент)

					ДП 6217. 00.0000.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92